

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**UNIDAD DE POSTGRADO**

**Estudios moleculares en *Bartonella bacilliformis* para el  
control de la enfermedad de Carrión**

**TESIS**

para optar el grado académico de Magíster en Biología Molecular

**AUTOR**

Lidia Escolástica Flores Aguilar

**ASESOR**

Luis J. Del Valle Mendoza

Ruth García De La Guarda

**Lima – Perú**

**2008**

Dedicado con mucho cariño a los seres que más amo en este mundo: mis progenitores, Ernesto y Yolanda, mis hermanos y leales guardianes, Tulio, Wenceslao, Ronald, Percy y Klauder, y a Enrique, quienes en conjunto son mi fuente de inspiración, motivo de alegría y felicidad, y cuyo apoyo incondicional, paciencia, amor, amistad, afecto y comprensión han sido pilares fundamentales para mi desarrollo personal y profesional en todos estos años de existencia; gracias a las acciones de cada uno de ellos he aprendido día a día, que en la vida uno tarde o temprano es capaz de conseguir lo que se propone, sólo hay que ser leales a nuestros principios y saber depositar la mayor confianza posible en uno mismo, perseverando sin desmayar en la lucha por materializar nuestros sueños pues quien la sigue la consigue.

*"La felicidad humana generalmente no se logra con grandes golpes de suerte, que pueden ocurrir pocas veces, sino con pequeñas cosas que ocurren todos los días".*

*Benjamin Franklin*

## AGRADECIMIENTOS

- Primero es indispensable tener que manifestar lo afortunada que soy al contar con una familia maravillosa, por ende quiero dar mi infinita gratitud a Ernesto y Yolanda, mis queridos padres, quienes en todo momento siempre saben brindarme mucho amor, confianza, paciencia, buenos consejos y un ilimitado apoyo. Así también, debo dar las gracias a mis adorados hermanos, que a pesar de no siempre ser la hermana comprensiva que quisieran, nunca he dejado de recibir de cada uno de ellos una palabra de aliento y una manifestación de cariño, muy por el contrario constantemente saben estar conmigo en las buenas y en las malas prestos a darme la mano sin recibir nada a cambio.
- Un especial y muy sincero agradecimiento al Dr. Luis Javier del Valle Mendoza, por haberme permitido desarrollar parte de la tesis en su Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología, de la Universidad Politécnica de Cataluña en Castelldefels-España. Además por su predisposición permanente e incondicional en apoyarme en todo lo que era necesario sin reparar en la inversión de dinero o tiempo que ello implicaba, confiando siempre en mí y contagiándome de la energía positiva que lleva dentro, por la buena voluntad en aclarar mis interrogantes regalándome muy buenos consejos y levantándome el ánimo cuando la situación se tornaba complicada; en una sola palabra, se constituyó en un gran amigo que hizo factible concretar este trabajo de investigación.
- De igual modo, quiero expresar mis congratulaciones a la Dra. Martha Vargas Orihuela y al Dr. Joaquim Ruiz, del Hospital Clínico de Barcelona, por el valioso apoyo recibido en la realización de varias partes experimentales de mi tesis, además por haberme brindado una gran amistad y compañía en momentos difíciles que nunca saben faltar en el curso de la vida.
- Un particular reconocimiento y agradecimiento a mi amiga y asesora de tesis, MSc. Ruth García de la Guarda, por su generosidad, confiar siempre en mí y permitirme trabajar a su lado, aprendiendo en todo momento de su amplia experiencia en el campo de la investigación, y por brindarme valiosas sugerencias y acertados consejos en la realización de la presente tesis, que fueron un estímulo para seguir creciendo intelectualmente.

- A Enrique Escobar, un caballero único y muy especial, que siempre me demuestra que con perseverancia, dedicación y mucho esfuerzo se concretan todas las aspiraciones, por estar a mi lado en las buenas y en las malas, proporcionándome una leal compañía, constante estímulo, ilimitado amor, solidaridad, comprensión y peculiares consejos que me han permitido crecer como persona y profesional.
- Al Dr. Pablo Ramírez, por sus enseñanzas científicas, consejos, valiosas críticas y aportes en la presente tesis.
- A la Dra. Juana María Cocha, Dra. Libertad Alzamora y Mag. Fernando Merino, profesores miembros del jurado, por sus buenas críticas e importantes aportes durante la revisión de la presente tesis.
- A mis amigos y colegas del Laboratorio de Microbiología Molecular, por su cálida compañía, solidaridad y gratos momentos compartidos.
- A mis amigas Beatriz Ibañez y Ruth Quispe por su paciencia y valiosa colaboración al inicio del presente trabajo.
- A Marithza Ramírez, una gran amiga que me enseñó a enfrentar los obstáculos con alegría y quien supo apoyarme y acompañarme en mis largas horas de trabajo dentro de la Universidad Politécnica de Cataluña.
- Al médico veterinario Percy Lezama por su ayuda en la obtención de la sangre de carnero.
- A la Señora Dora Aguilar, secretaria de la Unidad de Postgrado, por su orientación y ayuda en los trámites de la documentación correspondiente.
- Y a todas aquellas personas que en este momento no menciono pero que gracias a su ayuda recibida conseguí escalar esta nueva meta trazada, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

## ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
C3	Componente 3 del sistema de complemento
C4	Componente 4 del sistema de complemento
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleósido trifosfato
EC	Enfermedad de Carrión
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
L	Litro
M	Molar
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
pb	Pares de bases
<i>rRNA</i>	ácido ribonucleico ribosomal
g	Gravedades
SDS	Dodecil sulfato de Sodio
TAE	Tris-acetato-EDTA
T <sub>H</sub>	Linfocitos T helper
T <sub>S</sub>	Linfocitos T supresores
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micras
V	Voltios

## INDICE

	Pag.
<b>RESUMEN</b>	10
<b>SUMMARY</b>	13
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	16
1.1. Planteamiento del Problema	16
1.2. Justificación	21
1.3. Objetivos Generales	22
1.4. Objetivos Específicos	23
<b>2. ANTECEDENTES</b>	24
2.1. Marcadores moleculares y diagnóstico de <i>Bartonella bacilliformis</i>	26
2.2. Resistencia antimicrobiana de <i>Bartonella bacilliformis</i>	27
2.3. Antigenicidad de <i>Bartonella bacilliformis</i>	30
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	35
3.1. Cultivo de las bacterias	35
3.1.1. Preparación de los medios de cultivo	35
3.1.2. Siembra de las cepas	36
3.2. Extracción de DNA Genómico	37
3.3. Amplificación y secuenciación del gen <i>16S rRNA</i>	39
3.4. Amplificación de los genes <i>ialB</i> y <i>flaA</i>	41
3.5. Susceptibilidad antimicrobiana de <i>B. bacilliformis</i>	42
3.6. Amplificación y secuenciación de los genes <i>gyrA</i> y <i>parC</i> de <i>B. bacilliformis</i>	43
3.7. Aislamiento y clonación de los fragmentos amplificados de los genes <i>ialB</i> y <i>flaA</i> de <i>B. bacilliformis</i>	45
3.7.1. Purificación de los productos de PCR	45
3.7.2. Purificación del amplicón desde el gel de agarosa	46
3.7.3. Clonación de genes	47
3.8. Transformación en <i>Escherichia coli</i> TOP10	48
3.9. Análisis de las transformantes	49
3.10. Purificación de DNA plasmídico	49
3.10.1. Purificación con PureLink™ Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen)	50
3.10.2. Purificación con QIAprep® Miniprep (QUIAGEN)	50
3.11. Secuenciación de los genes <i>ialB</i> y <i>flaA</i>	51
3.12. Expresión de las proteínas recombinantes IalB y FlaA en <i>Escherichia coli</i> BL21 Star™ (DE3)	52

3.13. Purificación de las proteínas recombinantes IalB y FlaA	55
3.14. Diálisis, concentración y cuantificación de las proteínas purificadas	58
3.15. Inmunización de conejos con las proteínas recombinantes purificadas de <i>B. bacilliformis</i>	58
3.15.1. Preparación de las proteínas para la inoculación	58
3.15.2. Sangrías	59
3.16. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay)	61
3.17. Western Blot	63
<b>4. RESULTADOS</b>	65
4.1. Cultivo de las cepas de <i>Bartonella</i>	65
4.2. Aislamiento de DNA genómico	68
4.3. Amplificación y secuenciación del gen <i>16S rRNA</i>	71
4.4. Amplificación por PCR de los genes <i>ialB</i> y <i>flaA</i>	82
4.5. Susceptibilidad antimicrobiana de <i>B. bacilliformis</i>	88
4.6. Amplificación y secuenciación de los genes <i>gyrA</i> y <i>parC</i> de <i>B. bacilliformis</i>	89
4.7. Aislamiento y clonación de los fragmentos amplificados de los genes <i>ialB</i> y <i>flaA</i> de <i>B. bacilliformis</i>	96
4.8. Purificación de DNA plasmídico	100
4.9. Secuenciación de los genes <i>ialB</i> y <i>flaA</i>	104
4.10. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes IalB y FlaA en <i>Escherichia coli</i> BL21 Star <sup>TM</sup> (DE3)	113
4.11. Inmunogenicidad de las proteínas recombinantes IalB y FlaA	120
4.12. Western Blot	121
<b>5. DISCUSIÓN</b>	123
5.1. Cultivo de las cepas de <i>Bartonella</i>	123
5.2. Diagnóstico de <i>Bartonella bacilliformis</i>	126
5.3. Susceptibilidad antimicrobiana de <i>B. bacilliformis</i>	133
5.4. Expresión e inmunogenicidad de las proteínas recombinantes IalB y FlaA de <i>B. bacilliformis</i>	139
<b>6. CONCLUSIONES</b>	144
<b>7. RECOMENDACIONES</b>	145
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	146



## RESUMEN

La Enfermedad de Carrión, es causada por la bacteria *Bartonella bacilliformis*, que se transmite por varias especies del insecto vector del género *Lutzomyia*. No se conoce ningún reservorio animal, aparentemente el hombre es el único. Es una enfermedad endémica en el Perú y actualmente es considerada como reemergente debido a que su área geográfica se viene expandiendo. Es importante estudiar marcadores moleculares que sirvan para el diseño de métodos de diagnóstico rápido y efectivos, así como evaluar los antibióticos recomendados como medidas terapéuticas contra esta enfermedad, e indagar más acerca de las proteínas antigénicas de esta bacteria a fin de seleccionar antígenos candidatos para desarrollar, una vacuna contra esta enfermedad o pruebas de diagnóstico para su detección de laboratorio de mayor sensibilidad y especificidad que las actuales. IalB y FlaA son proteínas interesantes debido a su participación en la invasión bacteriana al eritrocito humano.

Con la finalidad de generar conocimientos básicos que permitan contribuir con el control de la Enfermedad de Carrión, (i) desarrollando pruebas de diagnóstico más eficientes, (ii) mejorando el tratamiento sobre la base de un mayor conocimiento de la susceptibilidad a antimicrobianos, y (iii) determinando antígenos candidatos para el desarrollo de una vacuna, es que en el presente trabajo se ha investigado los siguiente:

- (i) Se verificó la especificidad del gen *ialB* para *B. bacilliformis*, amplificando por PCR a partir de DNA genómico de seis especies del género *Bartonella*. Todas las especies del género *Bartonella* estudiadas fueron confirmadas por amplificación y secuenciación del gen *16S rRNA*.
- (ii) Se estudió la susceptibilidad de *B. bacilliformis* al ácido nalidíxico y ciprofloxacino usando el método de difusión de disco y método de E-test, y posteriormente se secuenciaron los genes diana (*gyrA* y *parC*) para estos antibióticos.
- (iii) Se obtuvieron las proteínas recombinantes IalB y FlaA, para ello, los genes *ialB* y *flaA* de *B. bacilliformis* fueron clonados en el vector de expresión pET101/D-TOPO®, que fusiona una cola 6xHis para facilitar la purificación de las proteínas

recombinantes, y se transformó con estas construcciones la cepa *Escherichia coli* TOP 10. Los genes *ialB* y *flaA* clonados fueron secuenciados por reacción de PCR con el kit BigDye<sup>®</sup> Terminador v3.1 Cycle Sequencing. Confirmada la secuencia correcta en pET101-*ialB* y pET101-*flaA* se expresaron en *E. coli* BL21 Star<sup>™</sup> (DE3). La proteína de invasión IalB y FlaA recombinante, fueron purificadas en condiciones nativas por afinidad a metal inmovilizado (agarosa unida a níquel), a través de la cola de histidinas. Luego, se evaluó la respuesta inmune humoral de estas proteínas en conejos de raza Nueva Zelanda. Se colectó sangre venosa de los animales inmunizados, fue colectada de acuerdo al protocolo de inmunización establecido, separando el plasma por centrifugación. Después mediante ELISA se cuantificaron los anticuerpos IgG y por Western Blot se evaluó la especificidad de los anticuerpos policlonales generados frente a las proteínas recombinantes puras y lisados totales de *B. bacilliformis*.

Se demostró que el gen *ialB* no es un marcador exclusivo de *B. bacilliformis* porque a partir del DNA genómico de *B. clarridgeiae*, se obtiene un producto de PCR con 96 % de homología en su secuencia al gen *ialB* de *B. bacilliformis*. Con respecto a la susceptibilidad antimicrobiana, todas las cepas de *B. bacilliformis* fueron ácido nalidíxico resistentes (MIC >256 mg/L), tres aislados presentan susceptibilidad disminuida frente a ciprofloxacino y tres fueron altamente resistentes (MIC>32 mg/L). Todas las cepas menos una (*B. bacilliformis* 35096) presentaron una Ala en posición 91 de GyrA y 85 de ParC. *B. bacilliformis* 35096 tiene una Val en posición 91 de GyrA siendo una de las cepas resistente a ciprofloxacino. En relación a las proteínas recombinantes obtenidas, las electroforesis PAGE-SDS evidenciaron que luego de 4 a 5 horas de inducción con IPTG, se obtiene muy buena expresión de las proteínas recombinantes IalB y FlaA. El protocolo de purificación ensayado permitió obtener una sola banda correspondiente a cada proteína pura.

Los resultados sugieren que el gen *ialB* además de estar presente en el genoma de *B. bacilliformis*, puede ser encontrado en otras Bartonellas como es el caso de *B. clarridgeiae*. En relación al tratamiento de la Enfermedad de Carrión, algunas cepas de *B. bacilliformis* presentan resistencia constitutiva a quinolonas que puede ser relacionado con la presencia de una Ala en posición 91 y 85 de GyrA y ParC, respectivamente. Finalmente, la clonación de los genes *ialB* y *flaA* ha permitido

producir y purificar las proteínas recombinantes IalB y FlaA, las cuales tienen capacidad antigénica y son inductoras de respuesta humoral antiproteínas nativas IalB y FlaA en el modelo de conejo, en este sentido son potenciales antígenos candidatos para el desarrollo de una vacuna o de una prueba inmunodiagnóstica.

**Palabras Clave:** gen *ialB*, *flaA*, *gyrA*, *parC*, proteína IalB, FlaA, *Bartonella bacilliformis*, ciprofloxacino, ácido nalidíxico.

## SUMMARY

Carrion's Disease is caused by *Bartonella bacilliformis* bacterium, and is transmitted by several species of the vector insect of the *Lutzomyia* genus. Animal reservoir is not known; seemingly the man is the only one. This disease is endemic in Peru and is actually considered as re-emergent because their geographical distribution comes expanding. Thus it is important to study its molecular markers for established diagnosis methods that are quick and effective. On the treatment aspect, it is necessary to evaluate the antibiotics used against the disease. On the therapeutic topic, more research is required regarding the antigenic proteins from this bacterium; this fact is important to develop future vaccine against this disease or diagnostic assay for their detection in the laboratory or to improve the sensitivity and specificity of the current methods. IalB and FlaA are interesting proteins due to than they are involved in the bacterial invasion to the human erythrocyte.

My goals were to generate basic knowledge to contribute to controlling Carrion's Disease by (i) developing more efficient diagnosis tests, (ii) improving the treatment based on better knowledge of susceptibility to antimicrobes, and (iii) determining candidate antigens to produce a vaccine. For this study I performed the following activities:

- (i) It was verified the specificity of the *ialB* gene for *B. bacilliformis*, amplifying by PCR this gene from genomic DNA of six species of the *Bartonella* genus. In this work, all the species of the *Bartonella* genus were confirmed by amplification and sequence of the *16S rRNA* gene.
- (ii) The susceptibility of *B. bacilliformis* to nalidixic acid and ciprofloxacin was studied using the disk diffusion and E-test method, and later on the target genes (*gyrA* and *parC*) for these antibiotics were sequenced.
- (iii) The IalB and FlaA recombinant proteins were obtained, for it, the *ialB* and *flaA* genes of *B. bacilliformis* were cloned in pET101/D-TOPO® expression vector, that contained a 6xHis tag to facilitate the purification of the recombinant proteins, and it was transformed with these constructions the TOP 10 *Escherichia coli* cells. The *ialB* and *flaA* genes cloned were sequenced by PCR reaction with the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit. Confirmed the correct

sequence in pET101-*ialB* and pET101-*flaA* were expressed in BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) *E. coli* strain. The IalB and FlaA recombinant, both invasion proteins were purified under native conditions by affinity using immobilized metal (agarosa-Ni resin), through the 6His tag. Then, humoral immune response was evaluated in New Zealand rabbit treatment with these proteins. It was collected venous blood of the immunized animals was collected according to the established immunization protocol, separating the plasma by centrifugation. Then, IgG antibodies levels were determined by ELISA and their specificity was evaluated by Western blot, for it, polyclones antibodies generated were assayed against the pure recombinant proteins and total extract of *B. bacilliformis*.

The results demonstrated that the *ialB* gene is not an exclusive marker of *B. bacilliformis* because it was obtained as PCR product from the genomic DNA of *B. clarridgeiae* with homology in its sequence of 96% in comparison to the gene *ialB* of *B. bacilliformis*. With regard to the antimicrobial susceptibility, all the strains of *B. bacilliformis* were resistant to nalidixic acid (MIC >256 mg/L), three isolated presents decreased susceptibility to ciprofloxacin and three were highly resistant (MIC>32 mg/L). All the strains except one (*B. bacilliformis* 35096) presents an Ala in the positions 91 of GyrA and 85 of ParC. *B. bacilliformis* 35096 have a Val in position 91 of GyrA, being one of the strains exhibiting resistance to ciprofloxacin. In relation to the recombinants proteins, the PAGE-SDS electrophoresis evidenced that after 4 at 5 hours of IPTG induction was obtained a high expression of IalB and FlaA recombinant proteins. The purification protocol allowed obtaining a single band corresponding to each pure protein.

The results suggest that *ialB* gene besides being present into genomic of *B. bacilliformis*, it can be found in other Bartonellas, and it has occurred to *B. clarridgeiae*. In relation to the treatment of the Carrion's Disease, some strains of *B. bacilliformis* present a constitutive resistance to quinolones which may be related with the presence of Ala in the position 91 and 85 of GyrA and ParC respectively. Finally, the clonation of the *ialB* and *flaA* genes allowed to produce and to purify the IalB and FlaA recombinant proteins, which have antigenic capacity and are inductive of humoral response IalB and FlaA natives antiproteins in the rabbit model, in this

way, they are antigen potentials for the development of a vaccine or a immunodiagnostic test.

Key words: *ialB* gene, *flaA*, *gyrA*, *parC*, IalB protein, FlaA, *Bartonella bacilliformis*, ciprofloxacin, nalidixic acid.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Planteamiento del Problema

La Enfermedad de Carrión (EC) es un proceso infeccioso humano, no contagioso, causado por la bacteria *Bartonella bacilliformis*. Esta bacteria se transmite a través de la picadura de varias especies aladas del insecto vector del género *Lutzomyia*, de las cuales la principal especie es *Lutzomyia verrucarum*. La EC es una enfermedad endémica del Perú, y sus tasas de incidencia reportadas fluctúan a lo largo de varias décadas, siendo las Direcciones de Salud de Ancash, Cajamarca (Jaén y Cutervo), Amazonas y La Libertad, las que tienen las tasas de incidencia más altas (Boletín Epidemiológico, 2004, 2007, 2008). En las áreas endémicas, el 60% o más de la población, es seropositiva a la bacteria, y entre 5 a 10% sufren la enfermedad (Knobloch et al., 1985). A pesar del tratamiento antimicrobiano, los reportes de letalidad oscilan entre 7,7 y 15%, incrementándose hasta 30 – 60% cuando hay compromiso neurológico. En las poblaciones no tratadas, la letalidad alcanzó un 88% (Maguiña, 1998).

Clínicamente, esta enfermedad presenta una primera fase o fase aguda denominada antiguamente “fiebre de la Oroya”, en donde *B. bacilliformis* invade el eritrocito humano ocasionando una etapa febril anémica muy grave. Si el individuo sobrevive a la fase aguda, y después de un periodo intercalar de duración variable, se presenta la fase eruptiva llamada también “verruca peruana”, caracterizada por el desarrollo de erupciones de magnitud diversa, con lesiones de diferente tamaño y profundidad, cuya localización, además de la tegumentaria, puede comprometer órganos internos (Ilher, 1996; Maguiña y Gotuzzo, 2000; Burstein y Mayta, 2007).

Debido a la expansión hacia nuevas áreas geográficas de transmisión en las regiones de la sierra, costa y selva alta del Perú, a que se ha observado un progresivo incremento en el número de casos y de su letalidad, es que actualmente la EC es considerada una enfermedad re-emergente del Perú y como una de las enfermedades metaxénicas más importantes en el país (Boletín Epidemiológico, 2007). Esta situación se ha producido después de los brotes ocurridos en las regiones andinas durante los años 1992-93 y 1998-99, los cuales probablemente están relacionados

con otras enfermedades metaxénicas, y con los cambios climatológicos ocasionados por la presencia del fenómeno El Niño (Zhou et al., 2002; Boletín Epidemiológico, 2007).

A pesar de esta situación, hasta la fecha no existen medidas de control y prevención eficaces contra esta enfermedad. Frecuentemente, la prevención se ha limitado a la fumigación con DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) para eliminar la población del insecto vector de la bacteria. Sin embargo, la enfermedad se ha mantenido, produciéndose rebrotes ocasionados probablemente por la resistencia del vector al insecticida (Krueger et al., 1995). Por otro lado, no se acepta la quimioprofilaxis con antibióticos como medida preventiva (Maguiña, 1998). A pesar de todos estos antecedentes, hasta el momento no se ha desarrollado una vacuna para prevenir la EC, ni hay publicaciones de trabajos realizados con esta finalidad, y los estudios acerca de los antígenos de *B. bacilliformis* son escasos.

Por otro lado, en la actualidad hay serias dificultades para un adecuado diagnóstico de esta bacteria, básicamente porque no se tienen estandarizadas técnicas más sensibles, específicas y rápidas que las que se vienen utilizando en la detección de este patógeno. La técnica de diagnóstico más empleada es un frotis de sangre, el que tiene baja sensibilidad, además que necesita ser confirmado a través de un hemocultivo, que si bien es más sensible y específico, demora un promedio de 15 días, debiendo dejar incluso los cultivos hasta por 45 días antes de ser descartados como negativos (MINSA, 2006; Ventura y Padilla, 2006). No existe entonces una mejora significativa dentro de las pruebas de diagnóstico que se emplean en los laboratorios de los centros de salud, ello se debe a que no se conocen marcadores específicos (proteínas, secuencias de DNA, etc.) que podrían ser utilizados en técnicas más eficientes y sensibles (e.g. western-blot, PCR, etc.). Se suma a este problema el inadecuado entrenamiento del personal de salud, la falta de información en la población para reconocer los signos y síntomas, la ubicación geográfica de las poblaciones expuestas, los factores económicos y culturales de las mismas. Toda esta situación entorno al diagnóstico de la EC influye de manera importante en los altos índices de letalidad de la enfermedad.



Frente a la ausencia de una vacuna contra *B. bacilliformis*, el tratamiento antimicrobiano de la EC es de crucial interés. Hasta la fecha existen muy pocas investigaciones sobre la susceptibilidad antimicrobiana en aislados clínicos de *B. bacilliformis*, tampoco hay publicaciones donde se detalle alguna metodología estandarizada y reproducible para su determinación *in vitro*. Diferentes agentes antibacterianos han sido usados para el tratamiento de infecciones por *B. bacilliformis*, tales como la eritromicina, cloramfenicol, rifampicina entre otros (MINSA, 2003; Rolain et al., 2004). Recientemente en el Perú, para el tratamiento de la EC las quinolonas en su forma de fluoroquinolona (e.g. ciprofloxacino) fue pautado como antibiótico de primera y/o segunda línea de tratamiento según el caso de la EC (MINSA, 2003, 2006; Tarazona et al., 2006). Las quinolonas son una familia de antibióticos sintéticos de amplio espectro, que incluyen ácido nalidíxico y fluoroquinolonas, los cuales se caracterizan por su buena penetración intracelular y por esta razón son usados en el tratamiento de infecciones debidas a patógenos intracelulares (Roig et al., 2006).

Las quinolonas actúan inhibiendo la acción de la DNA girasa y topoisomerasa IV. La DNA girasa es una enzima tetramérica compuesta por 2 subunidades A y dos subunidades B ( $A_2B_2$ ), las cuales son codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB* respectivamente. Las subunidades de la topoisomerasa IV están codificadas por los genes *parC* y *parE* (Ruiz, 2003).

La administración de ciprofloxacino para el tratamiento de la EC en fase aguda y eruptiva ha sido descrita desde el 2001. Aparentemente, el tratamiento contra la infección por *B. bacilliformis* usando ciprofloxacino había sido exitoso (Maguiña et al., 2001; Rolain et al., 2004). Sin embargo, hasta la actualidad no hay resultados publicados acerca de la experiencia de este tratamiento, además que ya se encontraron aislados de *B. bacilliformis* resistentes a ciprofloxacino *in vitro*, sugiriéndose que esta resistencia podría ocurrir en forma natural y que por lo tanto sería necesario realizar nuevas pruebas en más cepas de origen clínico. Asimismo, se ha demostrado la existencia de *B. bacilliformis* resistentes a rifampicina y eritromicina (Biswas et al., 2007) y se ha propuesto que concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de ácido nalidíxico podría ser usado como un marcador genérico

de resistencia para la familia de quinolonas en bacterias Gram negativas (Ruiz, 2003).

En los últimos años se han llevado a cabo numerosas investigaciones relacionadas con aspectos epidemiológicos, clínicos, serológicos, invasión a eritrocitos y otros, para entender la historia natural, patología y biología molecular de las especies de *Bartonella*. Así, mientras la información desarrollada acerca de estos puntos es relativamente extensa, el avance de los conocimientos inmunológicos con respecto a *B. bacilliformis* y en general a las especies de *Bartonella* es escaso. Se conoce muy poco acerca de las macromoléculas de *B. bacilliformis* que pueden tener capacidad antigénica e inducir respuesta inmune humoral y/o celular; además, los mecanismos inmunológicos que ocurren en el huésped infectado son desconocidos (Karem, 2000).

Por otro lado, se conocen algunas proteínas de *B. bacilliformis* que por su estructura y/o función son interesantes y podrían potencialmente tener capacidad antigénica para inducir respuesta inmune. La evaluación de estas proteínas como potenciales inmunógenos es condición indispensable para desarrollar a futuro una vacuna contra la EC.

El cultivo *in vitro* de *B. bacilliformis* es costoso y el crecimiento bacteriano es escaso y lento, lo que dificulta la extracción y la purificación de proteínas en cantidades suficientes para realizar estudios inmunológicos. Por ello, se ha planteado como método alternativo la obtención de proteínas recombinantes de *B. bacilliformis* expresadas en *Escherichia coli*, para evaluar sus potencialidades como inmunógenos.

Recientemente se ha renovado el interés en el estudio a nivel epidemiológico, clínico terapéutico e inmunológico de este patógeno, en nuestro medio y a nivel internacional. Una de las razones que motivan este interés científico es el incremento de la incidencia y su aparición en lugares que antes no reportaban la enfermedad, por ejemplo, la costa peruana. Otras razones son el hecho de que la bartonelosis humana producida por *B. bacilliformis* comparte características histopatológicas con otras enfermedades como la angiomatosis bacilar, causada por

otras especies de *Bartonella*; las características de ser un microorganismo que infecta intracelularmente, etc.

Este panorama de la EC, plantea de forma indispensable y necesaria realizar investigaciones que permitan diagnosticar, controlar y prevenir esta enfermedad endémica de nuestro país. En este sentido, en el presente trabajo de Tesis se evaluó la utilidad del gen *ialB* como posible marcador específico para el diagnóstico de la EC por PCR. Así también, se determinó la susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* de cepas de *B. bacilliformis*, aisladas en años previos y posteriores a la introducción de las primeras quinolonas en la práctica clínica, mediante el método de difusión por disco y el método del E-test, y la respectiva amplificación por PCR y secuenciación de la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR) en los genes *gyrA* y *parC* presentes en las cepas en estudio. Por otro lado, se evaluó la capacidad de la flagelina y la proteína de invasión IalB recombinantes de *B. bacilliformis* como posibles inductores de respuesta inmune humoral.

Las proteínas evaluadas fueron elegidas por su demostrada participación en el proceso de invasión de *B. bacilliformis* al eritrocito humano y por conocer las secuencias génicas de las mismas, lo cual permite su clonación. Se planteó la clonación y expresión en *E. coli* de las proteínas flagelina (FlaA) e IalB de *B. bacilliformis*, luego estas proteínas recombinantes fueron purificadas y se realizó la inmunización de conejos raza Nueva Zelanda.

Las hipótesis planteadas fueron que el gen *ialB* no es específico de *B. bacilliformis* por estar presente en otras especies del mismo género, luego que hay cepas de este patógeno que son constitutivamente resistentes a ácido nalidíxico y por lo menos poseen niveles de susceptibilidad disminuidos naturalmente frente a otras fluoroquinolonas más modernas, tales como el ciprofloxacino, existiendo cierta asociación entre dicha disminución de sensibilidad o resistencia y determinadas mutaciones génicas que podrían estar a nivel de los QRDR de los genes *gyrA* y *parC*. Además, que las proteínas flagelina e IalB pueden estimular el sistema inmune humoral de los animales tratados, lo cual puede ser evidenciado por un incremento de la IgG. Luego estos anticuerpos podrían ser empleados en un ensayo de invasividad *in vitro*, como anticuerpos neutralizantes para producir la inhibición

de la invasión de la bacteria al glóbulo rojo humano. De demostrarse este efecto inhibitorio, las proteínas flagelina e IalB podrían ser consideradas como potenciales inmunógenos para estudios posteriores tendientes a desarrollar una vacuna recombinante contra la infección producida por *B. bacilliformis*.

## **1.2. Justificación**

En los últimos años la EC se ha seguido expandiendo a nuevas áreas de transmisión, con reportes de brotes durante los años 2006 y 2007 en ciertos departamentos, tales como Lima, Ayacucho, Puno, La Libertad y Cajamarca. Siendo preocupante que a pesar de la endemidad y casuística, hasta la fecha no existan medidas eficaces que permitan diagnosticar, controlar y prevenir la EC. Aunque el control del vector y los tratamientos con antibióticos son relativamente efectivos hasta ahora, hace falta mejorar el diagnóstico y desarrollar una vacuna contra esta enfermedad.

Evaluar si existe algún gen de *B. bacilliformis*, que sirva como marcador específico, según sea o no único de la especie, puede ser aprovechado para desarrollar métodos de diagnóstico rápido o mejorar las pruebas de laboratorio existentes, de tal forma que en el quehacer rutinario el personal de salud tenga a su disposición técnicas más sensibles, específicas y reproducibles que conlleven a un diagnóstico seguro en un menor tiempo.

El manejo terapéutico de la EC se ha diseñado principalmente en base a la evaluación de la respuesta frente a un antibiótico en una serie de casos clínicos sin tener un grupo testigo. Hasta la fecha no se ha realizado un ensayo clínico, doble ciego y randomizado para evaluar la eficacia de un antibiótico sobre otro. De igual modo, son escasos los estudios que demuestran la resistencia *in vitro* de *B. bacilliformis* a los antibióticos y sólo sobre la base de la experiencia clínica se sabe que cada vez es más frecuente la falla terapéutica del cloramfenicol y de la rifampicina. Por esta razón se recomienda que la administración de los antibióticos sea supervisada por el personal de salud y que se asegure el tratamiento completo y en forma gratuita en el 100% de los casos. Frente a estos reportes de resistencia antimicrobiana es que el Instituto Nacional de Salud (INS) indica un esquema de uso

de antibióticos para el tratamiento de la enfermedad, consistiendo básicamente en ciprofloxacino (MINSA, 2006), pero existen casos en los que se vuelve a presentar la sintomatología de la fase aguda (bacteriemia) persistiendo por largo tiempo. Sin embargo se ha demostrado *in vitro* que estos antibióticos pueden producir fácilmente mutación en *B. bacilliformis*, en comparación con doxiciclina y gentamicina, que serían candidatos alternativos más adecuados para disminuir el porcentaje de adquisición de resistencia antimicrobiana. Por ello, la revisión de los niveles de sensibilidad a ciprofloxacino y su relación con determinadas mutaciones, contribuirán a mejorar el tratamiento de la EC y la vigilancia de la resistencia a antimicrobianos.

Por otro lado, el estudio de proteínas recombinantes de *B. bacilliformis*, que tengan propiedades antigénicas que les permitan servir como potenciales inmunógenos capaces de inducir una respuesta inmune constituirá un hallazgo que será de utilidad para investigaciones orientadas a diseñar a futuro una vacuna recombinante, que sea útil para el control y prevención de esta enfermedad endémica de nuestro país.

Por consiguiente, se considera que la información que se obtenga a partir de la presente investigación, servirá de base para que con estudios posteriores complementarios se planteen mejoras en el diagnóstico clínico, esquemas de tratamiento más adecuados y medidas preventivas eficaces, que contribuirán a la vigilancia y lucha contra la infección por *Bartonella bacilliformis*.

### **1.3. Objetivos Generales**

En base al planteamiento del problema presentado en este trabajo, se propusieron los siguientes objetivos generales:

- [1] Evaluar la utilidad del gen *ialB* como marcador específico de *Bartonella bacilliformis* para diseñar una prueba de diagnóstico de la enfermedad por PCR.
- [2] Establecer los niveles de susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Bartonella bacilliformis* frente a las quinolonas ciprofloxacino y ácido nalidíxico, mediante el análisis de las secuencias de los genes *gyrA* y *parC* por ser las dianas moleculares de estas quinolonas.

- [3] Determinar si los factores de virulencia FlaA (flagelina) e IalB (proteína de invasión IalB) de *Bartonella bacilliformis* inducen respuesta inmune humoral en conejos raza Nueva Zelanda.

#### 1.4. Objetivos Específicos

Con la finalidad de conseguir los objetivos generales que se proponen se han establecido los siguientes objetivos específicos:

- [1] Verificar mediante experimentos de PCR y secuenciación de los productos amplificados, si el gen *ialB* es específico de *Bartonella bacilliformis*. Para ello, el gen *ialB* será detectado en diferentes cepas de *Bartonella bacilliformis* y en otras especies del mismo género.
- [2] Determinar la MIC para ciprofloxacino y ácido nalidíxico, mediante pruebas de E-test y difusión por disco en cepas de *Bartonella bacilliformis*.
- [3] Amplificar por PCR la región determinante de resistencia a quinolonas de los genes *gyrA* y *parC* de aislados de *Bartonella bacilliformis* y analizar dichas secuencias para determinar las mutaciones asociadas a la resistencia a los antimicrobianos evaluados.
- [4] Clonar los genes *flaA* e *ialB* en el vector pET101/D-TOPO®, cepa *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen).
- [5] Expresar en la cepa *Escherichia coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) (Invitrogen) la proteína de invasión IalB y la proteína flagelar FlaA de *B. bacilliformis*.
- [6] Purificar las proteínas recombinantes obtenidas, a través de la cola de Histidina introducido durante la clonación.
- [7] Determinar mediante ensayos de ELISA y Western Blot, la capacidad de IalB y FlaA recombinantes de inducir inmunidad humoral en conejos raza Nueva Zelanda, cuantificando la producción de anticuerpos séricos. Así también, se podrá conocer si existen o no diferencias entre las dos proteínas recombinantes en estudio, en relación a la respuesta inmune humoral.

## 2. ANTECEDENTES

Actualmente el género *Bartonella* contiene más de 30 registros de *Bartonella* spp. y 25 de estos han sido identificados a nivel de especie. Las especies de *Bartonella* asociadas a enfermedades humanas son: *B. bacilliformis*, *B. quintana*, *B. henselae*, *B. vinsonii*, *B. elizabethae*, *B. clarridgeiae*, *B. grahamii*, *B. alsatica*, *B. koehlerae*, *B. rochalimae* y *B. washoensis*. Sin embargo de estas 11 especies, solamente 3 (*B. bacilliformis*, *B. quintana*, *B. henselae*) están implicadas en infecciones frecuentes (Pachas, 2001; Sayan, 2006; Ereemeeva et al., 2007).

*Bartonella bacilliformis*, es el agente etiológico de la EC, la cual es mal llamada Bartonelosis, Bartonelosis humana, “fiebre de la Oroya”, o “verruga peruana”. El término Bartonelosis es ambiguo y se refiere a la infección producida por cualquiera de las especies de *Bartonella* actualmente reconocidas por la comunidad científica. Asimismo, tampoco se refiere a si la infección es en humanos o animales. Como existen 11 especies de *Bartonella* identificadas como causantes de enfermedad en humanos, es inadecuado hablar innominadamente de Bartonelosis humana para referirse a una patología específica. La denominación de la EC como “fiebre de la Oroya” o “verruga peruana” es más inadecuado, porque la primera denominación sólo indica el lugar de una enfermedad, y la segunda sólo se refiere a una de las múltiples formas clínicas de la enfermedad (Boletín Epidemiológico, 2007; Burstein y Mayta, 2007).

La bacteria *Bartonella bacilliformis* es pleomórfica, y se ubica dentro del grupo de las  $\alpha_2$ -Proteobacterias de acuerdo a las características filogenéticas establecidas por hibridización DNA-DNA y por homología de las secuencias del gen *16S* del RNA ribosomal. Esta bacteria se caracteriza por ser un bacilo Gram negativo, de 0,2-0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro y 1-3  $\mu\text{m}$  de largo, aerobio no fermentativo, oxidasa negativo, catalasa positiva, hemotrófico e unipolar con 2 a 16 flagelos que le confieren gran movilidad (Ihler, 1996; Chamberlin et al., 2002; Ventura y Padilla, 2006). *Bartonella bacilliformis* es un patógeno intracelular facultativo de células endoteliales y eritrocitos, con un crecimiento muy lento de 2 a 8 semanas y de difícil cultivo, pudiendo ser cultivado a partir de muestras de sangre, biopsias de lesiones eruptivas o nódulos subcutáneos, sobre medios sólidos enriquecidos con sangre de

carnero y aminoácidos esenciales, a una temperatura óptima de crecimiento de 28°C. Es una bacteria no reactiva en test bioquímicos usados para identificación de bacterias. No utiliza los carbohidratos y al igual que *B. quintana* infecta sólo eritrocitos humanos (Pachas, 2001; Zeaiter et al., 2002; Ramón y Raoult, 2005).

Hasta la actualidad, no se conoce ningún reservorio animal adicional al hombre, aparentemente el hombre es el único. Esta enfermedad conocida desde la época precolombina, se encuentra restringida en el lado occidental de la cordillera de los Andes, ya que dicha región es el hábitat del insecto vector del género *Lutzomyia* (“titira”, “manta blanca”) cuyas especies identificadas son *L. verrucarum*, (Benson et al., 1986; Rolain et al., 2003), *L. noguchii*, *L. peruensis*, *L. pescei*, *L. bicornucis*, entre otras (Solano et al., 1991) y es transmitida por la picadura de la hembra (hematófaga) del insecto vector.

En el Perú, la EC se presenta en los valles interandinos comprendidos entre 500 a 3200 m.s.n.m, ubicados entre 2° de latitud norte y 13° de latitud sur (Maguiña, 1998; Birtles et al., 2002), abarcando los departamentos de Cajamarca, Amazonas, Piura, La Libertad, Ancash, Lima, Huanuco, Junín y Huancavelica. También se han reportado casos en el Valle del Mantaro, Ayacucho (Maguiña, 1993), en el Cusco, Trujillo y recientemente en Lambayeque, Loreto, Madre de Dios, San Martín y Ucayali (Amano et al., 1997; Sánchez et al., 1998; Ellis et al., 1999; Ventura y Padilla, 2006). Actualmente es considerada una enfermedad reemergente porque su área geográfica de incidencia se ha expandido (Pachas, 2001, Boletín Epidemiológico, 2007). En otros países de Sudamérica, la enfermedad se presenta en Ecuador (Loja, Manabí, Coaque) y Colombia (Nariño) (Brenner et al., 1991; Krueger et al., 1995).

*Bartonella bacilliformis* conjuntamente con *B. elizabethae*, *B. henselae*, y *B. quintana*, causan severos cuadros clínicos en humanos, y solamente *B. bacilliformis* puede infectar el 100% de los eritrocitos circulantes y lisar hasta el 80% de éstos (Reynafarje et al., 1961; Scherer et al., 1993).

La EC comprende cuatro fases o períodos:

- 1) La fase de incubación.



- 2) La fase hemática o aguda, que se caracteriza por un síndrome agudo de fiebre, malestar general, artralgias, mialgias y anemia hemolítica severa como consecuencia de la invasión del microorganismo a los eritrocitos. Se presenta una alta letalidad cuando el tratamiento no es administrado oportunamente.
- 3) La fase intercalar asintomática.
- 4) La fase tisular, histioide o verrucosa, que se desarrolla varias semanas después de la segunda fase y se caracteriza por la aparición de erupciones cutáneas angiomatosas luego de la invasión de las células endoteliales vasculares y de la estimulación de la formación de nuevos vasos sanguíneos por parte de la bacteria (Mitchell y Minnick, 1995).

### **2.1. Marcadores moleculares y diagnóstico de *Bartonella bacilliformis***

El diagnóstico directo de *Bartonella bacilliformis*, tanto en fase aguda como en fase tisular, es básicamente a través del frotis de sangre periférica y coloración con los derivados de Leishman, Romanosky, Giemsa o Wright. En las preparaciones se puede observar hasta un 100% de parasitismo de los glóbulos rojos, observando formas bacilares (jóvenes), cocoides (viejas) o cocobacilares. Sin embargo la sensibilidad de esta prueba, es muy variable y baja (30-70% en fase hemática y menos del 10% en fase verrucosa), necesitando ser confirmada por el aislamiento bacteriológico, a través de hemocultivos de sangre total o cultivos de biopsias en medios especiales (Maguiña, 1998; Ventura y Padilla, 2006).

Técnicas histológicas, inmunohistoquímicas, microbiológicas y serológicas, tales como la detección de anticuerpos, western blot, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y hemocultivo, son métodos utilizados en el diagnóstico del patógeno que tienen una mejor sensibilidad y especificidad. Sin embargo las pruebas serológicas constituyen la forma más frecuente de diagnóstico, usando para ello inmunofluorescencia indirecta (IFA) e inmunoabsorción ligadas a enzimas (ELISA), pero se han encontrado en algunos casos reacciones cruzadas con especies del género *Chlamydia* y con *Coxiella burnetti* (Birtles et al., 2000; Chamberlin et al., 2000; Mallqui et al., 2000; Huarcaya et al., 2003; Padilla et al., 2006).

Se han propuesto varios métodos por PCR para el diagnóstico de *B. bacilliformis*, tales como PCR- Nested, PCR-RFLP, entre otros, los cuales se basan en la detección del gen de la citrato sintasa (*gltA*), genes *16S* y *23S* del RNA ribosomal (*16S rRNA* y *23S rRNA*), secuencia intergénica *16S-23S* del RNA ribosomal (*ITS*), gen  $\alpha$  de la riboflavina sintasa (*ribC*), genes de las proteínas de shock térmico (*groEL*), proteínas que codifica la división celular (*ftsZ*) y gen de la sub-unidad  $\beta$  de la RNA polimerasa (*rpoB*) (Padilla et al., 1998; Renesto et al., 2001; Henríquez et al., 2002; Padilla y Ventura, 2003; Callison et al., 2005). Sin embargo estas pruebas no están diseñadas para el diagnóstico específico de *B. bacilliformis* en muestras clínicas, además que muchos de estos métodos requieren de una etapa de digestión de los productos de amplificación con enzimas de restricción o de la amplificación y posterior secuenciación del gen para la identificación de la especie de *Bartonella*. Estos métodos de diagnóstico significan etapas adicionales que encarecen y retardan el diagnóstico (Padilla y Ventura, 2003; Blanco y Raoult, 2005).

Por otro lado, el crecimiento *in vitro* de *B. bacilliformis* es lento, su cultivo en placas y/o tubos no es fácil y requiere de condiciones especiales, como el empleo de un medio enriquecido con sangre de carnero, una atmósfera húmeda y enriquecida con CO<sub>2</sub>, así como una temperatura de 28°C. En los cultivos se utiliza generalmente placas Petri con agar Columbia suplementado con 10% de sangre de carnero, o frascos con medio de cultivo bifásico, que está constituido por una fase sólida de agar Columbia con sangre de carnero al 10% y una fase líquida con medio RPMI suplementado con suero fetal bovino; una alternativa para la fase líquida es el medio infusión cerebro corazón (BHI). También se puede emplear agar de fases, medio fase de Colichon, F1 más RPMI, así como cultivos celulares. Estas condiciones de crecimiento y cultivo contribuyen dificultando el diagnóstico de este patógeno (Pachas, 2001; Ventura y Padilla, 2006).

## **2.2. Resistencia antimicrobiana de *Bartonella bacilliformis***

Antes de la era antibiótica, el único tratamiento disponible contra la anemia asociada a la EC, consistía en realizar transfusiones sanguíneas, pero este tratamiento era poco efectivo por lo que *B. bacilliformis*, tenía el honor de ser considerada la bacteria que poseía los niveles más altos de mortalidad. Con la introducción de los

agentes antibacterianos a inicios de los años cuarenta, se observó que este microorganismo presentaba altos niveles de susceptibilidad *in vitro* a muchas  $\beta$ -lactamasas, aminoglicósidos, macrólidos, doxiciclina y rifampicina, entre otros, con lo que fue minimizando su impacto (Ilher, 1996; Sobraques et al., 1999).

La fase hemática de la enfermedad usualmente era tratada con mucho éxito con el cloramfenicol, y la fase tisular con estreptomicina o rifampicina. Sin embargo, esos regímenes de antibióticos habían sido determinados empíricamente y las susceptibilidades antibióticas *in vitro* no se habían caracterizado. Según nuevos reportes, entre las fluoroquinolonas el ciprofloxacino había sido usado satisfactoriamente en un número limitado de pacientes (Maguiña, 1998; Sobraques et al., 1999).

Diferentes mecanismos están involucrados en el desarrollo de resistencia a fluoroquinolonas. Algunos son la consecuencia de mutaciones que involucran a los genes que codifican la DNA girasa y topoisomerasa IV. Otras mutaciones afectan la acumulación de quinolonas, es decir, hay una disminución en la captación intracelular de quinolonas. Esto último puede ser explicado por tres mecanismos diferentes: 1) un incremento en la impermeabilidad bacteriana a esos agentes antibacterianos, debido a la alteración en la composición o expresión de porinas y/o lipopolisacáridos; 2) una sobreexpresión de la bomba de eflujo de quinolonas de la célula bacteriana; y 3) la presencia de genes de resistencia a quinolonas en plásmidos, los cuales podrían ser transferidos horizontalmente (Tavio et al., 1999; Ruiz, 2003).

Sin embargo, la resistencia a fluoroquinolonas sería principalmente conferida por mutaciones puntuales a nivel de la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR), cerca al amino terminal de las subunidades A de la DNA girasa (GyrA) y topoisomerasa IV (ParC) (Minnick et al., 2003). Se han descrito substituciones de aminoácidos involucrados en el desarrollo de resistencias a quinolonas en *Escherichia coli*, ubicadas en la QRDR de los genes *gyrA* y *parC*. La presencia de una sola mutación en la QRDR del gen *gyrA* usualmente resulta en altos niveles de resistencia a ácido nalidíxico (Nal), pero para obtener altos niveles de resistencia a

fluoroquinolonas se requiere la presencia de mutaciones adicionales en *gyrA* o en otro blanco como *parC* (Ruiz, 2003).

Dado el potencial cada vez mayor del antibiótico ciprofloxacino para el tratamiento de la EC, Minnick et al. (2003) realizaron un estudio para determinar el blanco específico y frecuencia de mutaciones que confieren resistencia a esta droga en *B. bacilliformis*. Los resultados mostraron la presencia de una alanina (Ala) como el aminoácido silvestre en la posición 91 de la proteína GyrA, equivalente al 83 de *E. coli*. Además, el análisis de la secuencia completa del DNA de *B. bacilliformis* (GeneBank: NC 008783) reveló que el gen *parC* también codifica una Ala en la posición 85, equivalente a la posición 80 de *E. coli* (Minnick et al., 2003). Los puntos ya mencionados (83 de GyrA y 80 de ParC) son en gran medida, los dos puntos principales de mutación relacionados con la adquisición de resistencia a quinolonas en *E. coli*, y de manera general en cualquier microorganismo estudiado (Ruiz, 2003). En este sentido, en lo concerniente a *E. coli* se ha descrito que la presencia de Ala en posición 83 de GyrA resulta en un incremento notable en la concentración mínima inhibitoria (MIC) para ciprofloxacino (Cip), y en cuanto a la resistencia frente a ácido nalidíxico (Nal), ésta es afectada en bajos niveles (Tavio et al., 1999; Vila et al., 2000; Vila et al., 2001). Este hecho se ha relacionado con los mecanismos de interacción propuestos entre las quinolonas y sus blancos (Ruiz, 2003).

Es de especial importancia el hecho que una susceptibilidad disminuida en el MIC de fluoroquinolonas, se haya relacionado con una facilidad realzada para desarrollar resistencia completa contra estos agentes o producir fallas terapéuticas (Khan et al., 1997; Wain et al., 1997; Ruiz et al., 2002). Asimismo, otros microorganismos que poseen una Ala en cualquiera de las dos posiciones ya mencionadas, tales como *Brucella* spp., *Brevundimonas diminuta* u otras especies del género *Bartonella*, son constitutivamente resistentes a Nal, o presentan resistencia o niveles de susceptibilidad disminuida a Cip (frecuentemente con niveles de MIC alrededor de 0.125-0.5 µg/mL o más altos) (Han y Andrade, 2005; Dörbecker et al., 2006; Turan et al., 2007). De esta forma, estudios previos han evidenciado aislados de *B. bacilliformis* que presentan susceptibilidad disminuida a Cip (MICs alrededor

de 0.25 mg/L) así como a otras fluoroquinolonas (Sobraques et al., 1999; Dörbecker et al., 2006).

### **2.3. Antigenicidad de *Bartonella bacilliformis***

Hasta la actualidad, no se han reportado estudios sobre la antigenicidad de *B. bacilliformis*, se desconocen los inductores de respuesta inmune humoral y/o celular en los individuos afectados con la EC. De esta forma, la línea de trabajo para desarrollar una vacuna contra *B. bacilliformis* es potencialmente prometedora por sus alcances. Existen algunos reportes acerca del análisis y preparación de antígenos de este microorganismo (Knobloch, 1988). Así, usando sueros de conejo anti-Bartonella y sueros de pacientes en ensayos de inmunoprecipitación y western blot, se han determinado 24 antígenos de *B. bacilliformis*, designados de acuerdo a su peso molecular que varía de 16 a 160 kDa (Pachas, 2001). De éstos, sólo 12 antígenos fueron detectados por anticuerpos en suero de pacientes bartonelósicos usando inmunoblot, de los cuales seis (antígenos 18, 26, 36, 48, 65 y 75) fueron detectados por inmunoprecipitación (Knobloch, 1988), siendo el antígeno proteico de 65 kDa inmunoreactivo, y el único caracterizado como uno de los principales antígenos específicos presentes en todos los aislados de *B. bacilliformis* estudiados (Knobloch y Schereiber, 1990).

En cuanto a mecanismos inmunológicos en el huésped infectado, con relación a la inmunidad humoral se encontró que los enfermos en fase aguda anemizante presentan al principio un incremento significativo de IgM con valores normales de IgG, IgA, IgD, pero transcurridas cuatro semanas, existe un incremento moderado en la región de las gammaglobulinas. El C3 y C4 inicialmente están disminuidos hasta un 60% y 75%, pero a la cuarta semana se normalizan. En la etapa anémica había una ligera leucopenia y después leucocitosis, así como disminución significativa de los niveles de linfocitos T<sub>H</sub> en sangre circulante e incremento de los linfocitos T<sub>S</sub>. En cambio, en los individuos en fase eruptiva, los valores de gammaglobulinas y los niveles de IgG, IgA, IgM se encuentran levemente elevados, mientras que las proteínas del complemento C3 y C4 están dentro de los límites normales (Patrucco, 1983; Maguiña, 1998).

Contreras (1994), publicó una revisión exhaustiva de todos los estudios clínicos, patológicos y principalmente inmunológicos de la EC desde 1858 hasta 1994, destacando la existencia de inmunodeficiencia adquirida de tipo celular en la fase hemática, seguida por la aparición de infecciones oportunistas; asimismo, indica que se adquiere inmunidad permanente cuando se supera la fase verrucosa (Maguiña, 1998). Sobre la base de sus propias investigaciones, describe tres patrones de inmunidad humoral dependiendo de la evolución de la enfermedad. Hay un incremento de IgG en la evolución complicada. En la evolución favorable ocurre disminución de IgM e incremento de IgG, y en la evolución desfavorable no se evidencia disminución de IgM y poco incremento de IgG; por ello, en esta fase se podría descartar la inmunodeficiencia humoral (anergia específica) como la principal alteración inmune pero si se manifiesta una inmunodeficiencia celular transitoria. Se señala también que en la fase tisular, los mecanismos efectores de defensa ocurren en el tejido conjuntivo de la piel, lográndose a partir de la desaparición de las erupciones, una inmunidad adquirida duradera donde el papel fundamental es de tipo celular.

Karem et al. (1999) han realizado estudios en ratones BALB/c infectados experimentalmente, por rutas sistémica y mucosa, con la especie *Bartonella henselae* obteniendo información interesante acerca de la infección, bacteremia, inmunidad humoral e inmunidad celular. Estudios *in vitro* con *B. bacilliformis* muestran componentes de la membrana bacteriana con capacidad inmunogénica y presencia de anticuerpos neutralizantes en la inmunidad (Minnick, 1994) y de anticuerpos anti flagelo que reducen la penetración al eritrocito cerca al 100% (Scherer et al., 1993), todo esto muestra cierta actividad de inmunidad humoral, la cual no es total debido a la presencia de portadores asintomáticos crónicos en lugares donde la enfermedad es endémica. En presencia de inmunidad humoral, que se desarrolla después del estado febril anémico, las bacterias se retiran al tejido epitelial vascular, donde van a residir para luego causar el estado verrucoso necesitando entonces el desarrollo de inmunidad celular en forma de linfocitos T citotóxicos (CTL) para acabar con la infección (Karem, 2000).

Con respecto al uso de modelos animales de experimentación en *Bartonella*, se han usado gatos y primates no humanos, pero debido a las dificultades que estos

presentaban para estudios de funciones inmunes celulares, diversos investigadores vienen usando con éxito modelos roedores para estudios de infección, patología e inmunidad. Karem et al. (1999) han usado ratones BALB/c con *B. henselae*, Regnath et al., (1998) usaron ratones C57B6 también con *B. henselae*, Dehio (2004) reporta el uso de un modelo de rata para estudiar el curso de la invasión al eritrocito por *B. tribocorum* y de un modelo murino con *B. grahamii* para estudiar inmunidad humoral. Dehio (2004) también destaca que los modelos murinos son valiosos para entender mejor la enfermedad humana causada por *B. quintana* y *B. bacilliformis*. Scherer et al., (1993) utilizaron conejos blancos Nueva Zelanda para estudios de los efectos de anticuerpos anti flagelina en la invasión a los eritrocitos humanos.

Con relación a investigaciones sobre la biología molecular de los mecanismos de patogenicidad de *B. bacilliformis*, que son un pilar fundamental para diseñar a futuro una vacuna, el grupo que más viene publicando es el de Michael Minnick de la Universidad de Montana, Missoula, USA (Scherer et al., 1993; Minnick, 1994; Mitchell y Minnick, 1995; Minnick et al., 1996), para quienes este microorganismo es un modelo útil donde se puede estudiar los determinantes de virulencia involucrados en la colonización, adherencia e invasión de células hospedadoras.

Mitchell y Minnick (1995) han determinado que *B. bacilliformis* tiene un locus denominado *ialAB*, que contiene los genes *ialA* e *ialB*, cuyos productos de 170 y 186 aminoácidos, respectivamente, son ambos indispensables para la invasión de *B. bacilliformis* al eritrocito humano. También han encontrado que mutagénesis a nivel de *ialB* reduciría hasta 47 a 53% los niveles de asociación bacteriana e invasión al eritrocito humano. IalB es una proteína de membrana, localizada en la membrana interna del patógeno y es 63.6% homóloga a la proteína asociada a invasión Ail de *Yersinia enterocolitica* y Rck de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Coleman y Minnick, 2001). Además reportan que IalA contiene una región N-terminal con alto grado de homología a un dominio consenso de NTPasa. Conyers y Bessman (1999) y Cartwright et al. (1999) han aislado y analizado el locus de invasión *ialA* determinando su actividad de dinucleósido polifosfato hidrolasa que hidrolisa diadenosina y diguanosina, con la que contribuiría a reducir los niveles de stress ayudando a la sobrevivencia bacteriana.

Con relación a otros factores de virulencia, Mernaugh e Ihler (1992) han demostrado que una proteína extracelular de *B. bacilliformis*, llamada deformina, produce grandes cambios morfológicos en la superficie del eritrocito independientemente de la bacteria. La deformina ha sido purificada por Xu et al. (1995), quienes reportan que es una proteína de un peso molecular nativo de 130 kDa por cromatografía de exclusión en gel y de 67 kDa por PAGE-SDS, que probablemente se produce como un dímero en su estado nativo y es liberada en los medios de cultivo durante el crecimiento bacteriano, la cual induce indentaciones e invaginaciones en los eritrocitos humanos tratados.

Por otro lado, Benson et al. (1986) y Scherer et al. (1993) han demostrado la importancia del flagelo de *B. bacilliformis* para la invasión del eritrocito *in vitro*. Estos últimos autores han aislado, purificado y caracterizado flagelos de la cepa KC584 y luego han determinado su rol en la asociación e invasividad al eritrocito humano. Utilizando anticuerpos dirigidos contra el flagelo purificado se ha determinado que el componente principal es una proteína de 42 kDa llamada flagelina, la cual es parcialmente resistente a la tripsina y los primeros 17 aminoácidos de su cadena N-terminal tienen una similitud del 46% con la flagelina de *Caulobacter crescentis* (Ihler, 1996).

Los ensayos *in vitro* de invasión al eritrocito humano llevados a cabo con bartonelas expuestas a anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra la flagelina, mostraron una disminución significativa tanto en la asociación como en la invasión a eritrocitos humanos, lo que sugiere que los flagelos son un importante componente en la invasividad de *B. bacilliformis* y puede actuar sinérgicamente con la deformina para facilitar la entrada de la bacteria dentro de las invaginaciones producida por la deformina (Scherer et al. 1993). Otro hallazgo interesante es el de Padmalayan et al. (1997) quienes han detectado un antígeno inmunorreactivo a partir de una genoteca de *B. bacilliformis*, utilizando suero de un paciente en fase crónica. El antígeno ha sido denominado FtsZ y hay evidencias que su región C-terminal estaría involucrada en la antigenicidad y que estaría, por lo menos parcialmente, expuesta a la superficie celular. Con relación a otros antígenos, Minnick (1994) purificando membranas por centrifugación en gradiente de sucrosa y haciendo análisis electroforéticos, identificó 14 proteínas de membrana externa de *B.*



*bacilliformis*, que suelen ser bastante inmunogénicas en varios microorganismos, y cuyo peso molecular varia de 11.2 a 75.3 kDa, de las cuales las de 31.5, 42 y 45 kDa pueden representar las proteínas de membrana externa inmunodominantes.

Finalmente, la publicación del mapa físico del genoma de *B. bacilliformis* (Krueger et al., 1995), y recientemente la secuenciación del genoma completo (NCBI Microbial Genomes Annotation Project, accesión NZ\_AANF01000001) son de singular importancia para los estudios a nivel molecular. Se ha determinado que se trata de una molécula de DNA circular de alrededor de 1,600 kb (39-40% GC) en el que se han localizado los operones rRNA, el locus asociado a invasión y el gen de flagelina (Pachas, 2001). Combinando el uso de técnicas recombinantes con modelos animales puede obtenerse información detallada acerca de las características biológicas de *Bartonella*, incluyendo virulencia, patogenicidad e inducción de factores inmunes en el hospedero (Karem et al., 1999).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Cultivo de las bacterias

Se utilizaron cepas patrones de *B. henselae* CIP 103737, *B. vinsonii* subsp. *vinsonii* CIP 103738, *B. elizabethae* CIP 103761, *B. clarridgeiae* CIP 104772, *B. bovis* CIP 106692 y *B. bacilliformis* (CIP 57.17, CIP 57.18, CIP 57.19 y CIP 57.20 aisladas el año 1957 y CIP 77.27 aislada el año 1977), del Instituto Pasteur de Paris – Francia, así como una cepa clínica de *B. bacilliformis* (35096) aislada de paciente el año 2006, proporcionada por el Instituto Nacional de Salud - MINSA.

Todas las cepas fueron cultivadas en medios bifásicos, utilizando como fase sólida Agar Columbia enriquecido con 10% de paquete celular de sangre de carnero para el caso de *B. bacilliformis* y 10% de sangre total de caballo para las otras 5 especies de *Bartonella*, y como fase líquida se usó caldo infusión cerebro corazón (BHI) (Colichón y De Bedon 1973; Mallqui, 1998; Coleman y Minnick, 2001). Los cultivos fueron incubados a 28°C, en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire (incubadora NUAIRE DHD Autoflow), durante 1 a 6 semanas y 2 a 3 semanas, para el caso de *B. bacilliformis* y demás especies de *Bartonella* respectivamente.

##### 3.1.1. Preparación de los medios de cultivo

Todo el proceso de preparación se desarrolló dentro de una cabina de flujo laminar (NUAIRE Class II), con los debidos cuidados de esterilidad y asepsia. La sangre de carnero fue colectada en bolsas de 450 mL que contenía 63 mL de Citrato de Sodio al 2.63%, luego repartida en frascos de vidrio estériles de 50 y 100 mL, y almacenados por 1 a 2 días a 4°C antes de su uso para la sedimentación de los eritrocitos y formación de 2 fases bien diferenciadas (plasma sanguíneo y paquete celular). Con la sangre de caballo se procedió de la misma manera excepto que no hubo necesidad de dejar en reposo debido a que en este caso se usó sangre total y además los eritrocitos de caballo sedimentan de inmediato, debiendo homogenizar siempre la sangre antes de adicionarla al agar.

Los medios bifásicos se prepararon en tubos de ensayo tapa rosca de 25 x 150 mm, para ello se vertió 4,25 g de Agar Columbia deshidratado en 90 mL de agua

destilada (peso equivalente para 100 mL de agua destilada), se mezcló, calentó hasta disolver y se autoclavó a 121°C por 15 minutos. Se dejó enfriar hasta una temperatura de 45°C a 50°C (para evitar la lisis de los eritrocitos) y se agregó con una pipeta estéril sangre al 10% (v/v), es decir 10 mL de sangre de carnero (paquete globular) o caballo (sangre total); se homogenizó y repartió en los tubos de vidrio, para luego disponerlos de tal modo que el medio solidifique en plano inclinado. Después se controló su esterilidad por 3 a 5 días a temperatura ambiente, luego de lo cual se adicionó caldo BHI estéril de tal forma que exista una altura de 1.5 a 2 cm de fase líquida en el medio bifásico. Finalmente, todos los tubos conteniendo medio bifásico fueron controlados a temperatura ambiente por 48 a 72 horas y luego conservados a 4°C hasta su utilización.

Adicionalmente se prepararon placas Petri con Agar Columbia suplementado con 10% de paquete celular de sangre de carnero para los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana. Las placas fueron controladas a temperatura ambiente durante 48 a 72 horas y luego conservadas previamente selladas con parafilm a 4°C en bolsas herméticas hasta su uso.

### **3.1.2. Siembra de las cepas**

Las cepas del Instituto Pasteur, *B. bacilliformis*, *B. henselae*, *B. vinsonii* subsp. *vinsonii* y *B. elizabethae* fueron recibidas como liófilos, pero *B. clarridgeiae*, *B. bovis*, y la cepa clínica *B. bacilliformis* 35096 fueron recepcionadas congeladas a -80°C.

A las cepas liofilizadas y congeladas se les agregó 2 mL y 1 mL de caldo BHI respectivamente, se homogenizó y repartió en 4 tubos con medio bifásico, los cuales fueron incubados a 28°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire por más de 1 semana. Posteriormente, cada tubo con crecimiento de colonias de *Bartonella*, fue resembrado en medios bifásicos, separando el cultivo crecido en fase líquida del crecido en fase sólida, para esto previamente se agitó el caldo dentro del tubo con la finalidad que se mezcle con las bacterias presentes en la superficie sólida, teniendo cuidado que el caldo no toque la tapa del tubo ni se rompa el agar sangre. La fase líquida de un tubo conteniendo cultivo crecido de *Bartonella* fue vertida de manera

equitativa a 2 medios bifásicos frescos. De la fase sólida se cosechó con la ayuda de un asa de siembra descartable y estéril todas las colonias aún presentes de *Bartonella* y se sembraron por estriado a 2 medios bifásicos frescos. Se homogenizó la fase líquida y luego se bañó la superficie de la fase sólida del medio bifásico con la fase líquida. Se incubó a 28°C, humedeciendo cada 2 días como máximo la fase sólida con la fase líquida.

Para los sucesivos sub-cultivos, la fase líquida de un tubo crecido con *Bartonella* se depositó en un eppendorf estéril, se centrifugó a 12000 g por 2 minutos, se descartó el sobrenadante y se agregó 0.5 mL de caldo BHI estéril para luego ser vertido a un medio bifásico fresco; con la fase sólida se procedió de la misma manera que se detalla anteriormente.

### **3.2. Extracción de DNA Genómico**

Antes de realizar las extracciones de DNA de las cepas de *Bartonella bacilliformis* se realizó una PCR de colonia para amplificar el gen *ialB* (ver apartado 3.4) con el kit comercial Expand High Fidelity (Roche). En esta PCR se utilizó un DNA obtenido a partir de una suspensión de bacterias en agua ultrapura, la que fue centrifugada 1 minuto a 13000 g como un lavado previo al shock térmico (con el fin de eliminar en el sobrenadante restos de hemoglobina, medio, etc), luego el sedimento celular se volvió a resuspender en agua ultrapura y se sometió a ebullición por 5 a 7 minutos, se llevó 1 minuto a 4°C e hizo un spin a 13000 g, tomando el sobrenadante como molde. El objetivo de esta PCR fue confirmar que el crecimiento bacteriano correspondía a *B. bacilliformis*.

El DNA genómico de las 6 especies de *Bartonella* estudiadas (*B. henselae*, *B. vinsonii* subsp. *vinsonii*, *B. elizabethae*, *B. clarridgeiae*, *B. bovis* y *B. bacilliformis*) fue purificado usando el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, USA) dentro de la cabina de flujo laminar, utilizando en todo momento material nuevo y estéril. En el caso de *B. bacilliformis* la extracción se realizó a partir de 10 a 12 tubos de cultivo, para *B. clarridgeiae* y *B. bovis* se usaron de 8 a 10 tubos, y para el resto de cepas de 2 a 3 tubos. Todas las extracciones fueron realizadas a partir de cultivos frescos incubados a 28°C.

Antes de iniciar la extracción, se prepararon 2 baños maría estabilizados a 37°C y 80°C. A partir de medios bifásicos con cultivos frescos se cosecharon las células necesarias para la extracción. La fase líquida de cada tubo fue vertida en eppendorfs de 2 mL, en cambio de la fase sólida con la ayuda de un asa de siembra descartable con aro de 1 µL, se colectaron todas las colonias del agar en caldo BHI contenido en eppendorfs de 2 mL. Los eppendorfs fueron centrifugados y se descartó el sobrenadante, según el sedimento obtenido se agregó 100 ó 200 µL de agua ultrapura a cada eppendorf, para el lavado respectivo previa resuspensión de las células, se volvió a centrifugar, se descartó por completo el sobrenadante y se obtuvo el sedimento celular requerido para la obtención del DNA.

A un sedimento celular (equivalente al obtenido de 3 a 4.5 mL de un cultivo de toda la noche de *E. coli*) se le agregó 600 µL de solución de lisis nuclear, se pipeteó suavemente hasta la completa resuspensión de las células. Se incubó a 80°C por 5 minutos para producir la lisis celular, luego se enfrió por 5 a 10 minutos a temperatura ambiente. Al lisado celular, se añadió 3 µL de solución de RNasa A, y el eppendorf fue mezclado invirtiéndolo de 2 a 5 veces y se incubó a 37°C por 1 hora. Luego, la muestra fue enfriada a temperatura ambiente. Se adicionó 200 µL de solución de precipitación de proteínas, se llevó al vortex por 20 segundos a máxima velocidad para mezclar e incubó 5 minutos sobre hielo. Se centrifugó a 13000 g por 3 minutos y transfirió el sobrenadante conteniendo el DNA a un eppendorf nuevo de 1.5 mL que contenía 600 µL de alcohol isopropílico a temperatura ambiente. Se mezcló suavemente por inversión hasta que las hebras de DNA formen una masa visible, luego los eppendorf fueron centrifugados a 13000 g por 2 minutos. Con mucho cuidado se descartó el sobrenadante y se secó el tubo eppendorf con papel absorbente. Se adicionó 600 µL de etanol al 70% a temperatura ambiente y suavemente se invirtió el tubo varias veces para lavar el sedimento de DNA. Se centrifugó a 13000 g por 2 minutos, con mucho cuidado se aspiró el etanol y se secó con papel absorbente primero y luego al ambiente por unos 10 a 15 minutos para la evaporación total del etanol. Finalmente, se agregó 50 µL de solución de rehidratación de DNA y se dejó toda la noche a 4°C. Las muestras de DNA fueron cuantificadas por espectrofotometría y almacenadas a -20°C hasta su uso.

### 3.3. Amplificación y secuenciación del gen *16S rRNA*

Se realizaron reacciones independientes de 100  $\mu$ L que contenían:

- La amplificación del gen *16S rRNA* se realizó con el siguiente programa:

- 38

La polimerasa Taq High Fidelity tiene actividad exonucleasa 3'-5' ("proofreading"), lo cual aseguró la fidelidad y especificidad de los productos PCR obtenidos. La temperatura de hibridación ("annealing") de 55°C fue elegida teniendo en cuenta la temperatura media (T<sub>m</sub>) de los oligonucleótidos utilizados.

Para la secuenciación se realizó previamente una reacción de PCR con el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) usando como molde los productos de PCR obtenidos anteriormente, los cuales fueron previamente purificados con el kit Purelink™ PCR Purification (Invitrogen) (ver apartado 3.7.1). El kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing se fundamenta en el método de Sanger et al. (1977) y Murray (1989).

Se prepararon reacciones de secuenciación de un volumen final de 10 µL mezclando los siguientes componentes:

- Terminator Ready Reaction Mix      4 µL
- Molde (producto de PCR)              5.8 µL
- Oligonucleótido (directo o reverso) 0.2 µL (3.2 pmol)
- H<sub>2</sub>O ultrapura                              0 µL

Las temperaturas y tiempos programados en el termociclador para realizar la PCR de secuenciación del gen *16S rRNA* fueron:

- |                      |      |                                     |
|----------------------|------|-------------------------------------|
| 1) Desnaturalización | 96°C | 1 minuto                            |
| 2) Desnaturalización | 96°C | 30 segundos                         |
| 3) Hibridación       | 55°C | 30 segundos                         |
| 4) Polimerización    | 60°C | 4 minutos (25 ciclos del paso 2- 4) |
| 5) Pausa             | 4°C  | ∞                                   |

La temperatura de hibridación fue 55°C, por ser la T<sub>m</sub> de los oligonucleótidos 1510R y 8F. Las reacciones de secuenciación se hicieron en el Hospital Clínico de Barcelona, utilizando un secuenciador automático (Abi Prism 377; Perkin Elmer). Los fragmentos secuenciados fueron comparados con las secuencias de *16S rRNA* disponibles en la base de datos del NCBI.

### 3.4. Amplificación de los genes *ialB* y *flaA*

Los genes *ialB* y *flaA* fueron amplificados por PCR con los oligonucleótidos partidores (“primers”), diseñados sobre la base de las secuencias publicadas en los trabajos de Mitchell y Minnick (1995), y sobre las secuencias que aparecen en el GenBank (L20677 y L25276). El procedimiento del PCR se realizó de acuerdo a Ausubel et al. (1997) y Delidow et al. (1996). La amplificación del gen *ialB* se hizo a partir del DNA genómico purificado de todas las cepas de *Bartonella*, en cambio el gen *flaA* sólo se amplificó a partir de genoma de *Bartonella bacilliformis*. El termociclador Tpersonal (Biometra) fue programado con el siguiente protocolo:

1. Desnaturalización 94°C 5 minutos.
2. Desnaturalización 94°C 2 minutos.
3. Hibridación 55 a 60°C 2 minutos.
4. Polimerización 72°C 2 minutos (30 ciclos del paso 2 al 4).
5. Extensión 72°C 10 minutos.
6. Pausa 4 °C ∞

Para los PCR a partir de DNA genómico de *B. bacilliformis* se utilizó los kits con las enzimas AccuPrime™ Pfx DNA polymerase y AccuPrime™ Taq DNA polymerase High Fidelity (Invitrogen), y para las otras cepas de *Bartonella* se utilizó el kit Expand High Fidelity PCR System (Roche). La enzima AccuPrime™ Taq DNA polymerase High Fidelity tiene actividad exonucleasa 3’-5’ (“proofreading”) y además adiciona una deoxiadenosina (A) en el extremo 3’ del producto PCR. Con cada DNA genómico de las cepas de *B. bacilliformis*, se prepararon reacciones de 50 µL de volumen final, para amplificar el gen *ialB* y *flaA*, tal como se detalla a continuación:

- 10X AccuPrime™ PCR Buffer II 5 µL
- Oligonucleótido directo (*ialB/flaA*) 1.2 µL/1.6 µL
- Oligonucleótido reverso (*ialB/flaA*) 1.4 µL/1.6 µL
- Molde (DNA genómico) 2 µL
- AccuPrime™ Taq High Fidelity 0.2 µL
- Agua ultrapura 40.2 µL/39.6 µL



Con el kit Expand High Fidelity PCR System (Roche), se prepararon reacciones de 50  $\mu\text{L}$  que contenían:

- dNTPmix 1  $\mu\text{L}$  del stock 10 mM
- Oligonucleótido directo 1.2  $\mu\text{L}$
- Oligonucleótido reverso 1.4  $\mu\text{L}$
- Molde (DNA genómico) 2  $\mu\text{L}$
- Taq High Fidelity 0.75  $\mu\text{L}$
- Buffer PCR 5  $\mu\text{L}$
- H<sub>2</sub>O ultrapura 38.65  $\mu\text{L}$

Los genes *ialB* y *flaA* fueron amplificados con la enzima AccuPrime™ Taq DNA polymerase High Fidelity preparando reacciones de 100  $\mu\text{L}$  que constaban de los siguientes reactivos:

1. 10X AccuPrime™ Pfx reaction mix 10  $\mu\text{L}$
2. Oligonucleótido directo (*ialB/flaA*) 2.4  $\mu\text{L}$ /3.2  $\mu\text{L}$
3. Oligonucleótido reverso (*ialB/flaA*) 2.8  $\mu\text{L}$ /3.2  $\mu\text{L}$
4. Molde (DNA genómico) 4  $\mu\text{L}$
5. AccuPrime Pfx DNA Polymerase 0.8  $\mu\text{L}$
6. Agua ultrapura 80  $\mu\text{L}$ /78.8  $\mu\text{L}$

### 3.5. Susceptibilidad antimicrobiana de *B. bacilliformis*

Para los estudios de susceptibilidad de *Bartonella bacilliformis* a quinolonas, se utilizó como antibióticos a ciprofloxacino y ácido nalidíxico. Se establecieron dos protocolos de estudio, un método cualitativo a través del ensayo de difusión por disco, para detectar la resistencia o susceptibilidad de cada cepa (Bauer et al., 1966), y un método cuantitativo como es el método de gradiente de antibiótico, denominado comúnmente como E-test (Ab Biodisk, Sölma, Sweden), el cual se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. El método del E-test permite mediante lectura directa determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de cada antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* del inóculo bacteriano ensayado, el mismo que fue previamente estandarizado.

En ambos estudios se estandarizó el inóculo bacteriano que se utilizó, a un valor de 0.5 de la escala de McFarland, para lo cual a partir de medios bifásicos sembrados se cosecharon células de *B. bacilliformis* tanto de fase sólida como de fase líquida y se resuspendieron en caldo BHI estéril hasta alcanzar la turbidez visualmente comparable a la solución del estándar (0.5 de McFarland) preparado previamente. El estándar fue agitado antes de ser comparado en forma visual con el inóculo. Para ello se miraron ambos tubos al mismo tiempo contra un fondo blanco con una línea negra como contraste.

Luego de preparado el inóculo, éste fue depositado con la ayuda de una micropipeta sobre una placa de Agar Columbia suplementado con sangre de carnero al 10%, y mediante el uso de hisopos estériles cada cepa de *B. bacilliformis* fue sembrada por diseminación de manera de obtener un crecimiento confluyente, para lo cual se estrío con el hisopo en forma paralela y bien compacta abarcando toda la superficie de la placa. Luego se repitió el procedimiento rotando la placa 60° en dos oportunidades más. Se extremaron los cuidados en sembrar las placas de borde a borde, para evitar problemas posteriores en la realización de las lecturas. Las placas fueron secadas a temperatura ambiente de 3 a 5 minutos, antes de colocar con una pinza estéril, los discos y tiras. Por cada cepa de *B. bacilliformis* se empleó 3 placas de Agar Sangre, a una placa se le adicionó un disco de cada antibiótico, y a cada una de las otras dos una tira de E-test (tiras plásticas no porosas que tienen impregnadas una gradiente de concentración de un antibiótico dado equivalente a 15 diluciones), en este caso Nal o Cip. En todos los casos las placas fueron incubadas por 15 días a 28°C en una atmósfera con CO<sub>2</sub>, siendo controladas diariamente, para valorar la presencia de posibles agentes contaminantes que pudieran distorsionar los resultados. Cabe mencionar que los discos de ácido nalidíxico contenían 30 µg del antibiótico y los de ciprofloxacino sólo 5 µg, mientras que las tiras de ambos antibióticos venían impregnadas con concentraciones crecientes de cada antibiótico que iban desde 0.016 µg/mL a 256 µg /mL.

### **3.6. Amplificación y secuenciación de los genes *gyrA* y *parC* de *B. bacilliformis***

La region determinante de resistencia a quinolonas (QRDR) de los genes *gyrA* y *parC* fue amplificada usando los oligonucleótidos reportados por Minnick et al.

(2003) y otros diseñados en base a las secuencias publicadas en el NCBI. Para las PCR se utilizó el kit comercial Expand High Fidelity (Roche) usando como molde los DNA genómicos purificados en reacciones independientes de 100 µL que contenían:

- dNTPmix 2 µL del stock 10 mM
- Oligonucleótido directo 3 µL del stock 10 mM
- Oligonucleótido reverso 3 µL del stock 10 mM
- Molde (DNA genómico) 4 µL
- Taq High Fidelity 1.5 µL
- Buffer PCR 10 µL
- H<sub>2</sub>O ultrapura 76.5 µL

La amplificación de ambos genes se realizó con el siguiente programa:

- 1) Desnaturalización 94°C 5 minutos.
- 2) Desnaturalización 94°C 1 minuto.
- 3) Hibridación 55°C 1 minuto.
- 4) Polimerización 72°C 1 minuto (35 ciclos del paso 2-4).
- 5) Extensión 72°C 10 minutos.
- 6) Pausa 4°C ∞

Los productos PCR fueron purificados con el kit Purelink<sup>TM</sup> PCR Purification (Invitrogen) (ver apartado 3.7.1), y luego usados como molde en reacciones de secuenciación, que fueron preparadas haciendo la siguiente mezcla de reactivos:

- Terminator Ready Reaction Mix 4 µL
- Molde (producto PCR) 5.7 µL
- Oligonucleótido 0.3 µL
- H<sub>2</sub>O ultrapura 0 µL

Las temperaturas y tiempos programados en el termociclador para realizar la PCR de secuenciación de los genes *gyrA* y *parC* fueron:

- |                      |      |                                      |
|----------------------|------|--------------------------------------|
| 1) Desnaturalización | 96°C | 1 minuto.                            |
| 2) Desnaturalización | 96°C | 30 segundos.                         |
| 3) Hibridación       | 55°C | 30 segundos.                         |
| 4) Polimerización    | 60°C | 4 minutos (25 ciclos del paso 2- 4). |
| 5) Pausa             | 4°C  | ∞                                    |

Dos amplificaciones por PCR diferentes de cada QRDR de los genes *gyrA* y *parC* fueron secuenciados para evitar posibles errores introducidos por la *Taq*. En todos los casos los productos PCR fueron secuenciados en ambas direcciones. Los fragmentos secuenciados fueron comparados con las secuencias de los genes *gyrA* y *parC* disponibles en la base de datos del GenBank.

### **3.7. Aislamiento y clonación de los fragmentos amplificados de los genes *ialB* y *flaA* de *B. bacilliformis***

Los amplicones resultantes de cada reacción de PCR de *B. bacilliformis* fueron previamente verificados mediante electroforesis de agarosa al 1% según el método descrito por Sambrook et al. (1989). Los geles de agarosa ultrapura (Gibco BRL®) al 1%, se prepararon en buffer TAE 1X. Los geles contenían 5 µL de bromuro de etidio al 1% para visualizar las bandas por transiluminación de luz UV. Las muestras de DNA se mezclaron con buffer de carga 5X (0.05% azul de bromofenol, 40% sucrosa, 0.5% de SDS y EDTA 0.1 M pH 8.0). Como marcadores estándar de peso molecular se utilizaron 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®) y Leon™.

#### **3.7.1. Purificación de los productos de PCR**

Los fragmentos amplificados se purificaron de los restos de oligonucleótidos y DNA molde, mediante el kit Purelink™ PCR Purification (Invitrogen). Antes de la purificación, el kit fue reconstituido adicionando 10 mL de isopropanol al 100% a 15 mL de buffer de unión y 32 mL de etanol al 100% a 8 mL de buffer de lavado.

Se adicionó 4 volúmenes de buffer de unión a 1 volumen de reacción de PCR (50–100 µL), se mezcló bien y colocó a una columna spin en un eppendorf, se centrifugó a 13000 g por 1 minuto y descartó el eluido. Se lavó la columna con 650 µL de buffer de lavado, se centrifugó a 13000 g por 1 minuto y descartó el eluido. Se

volvió a centrifugar por 2 a 3 minutos a 13000 g para remover algún residuo de buffer de lavado. La columna spin se colocó en un eppendorf limpio y se eluyó el amplicón adicionando al centro de la columna 50 µL de buffer de elución. Se incubó 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 13000 g por 2 minutos. Los productos de PCR purificados fueron verificados con una electroforesis en agarosa al 1%. Finalmente, el amplicón purificado se almacenó a -20°C.

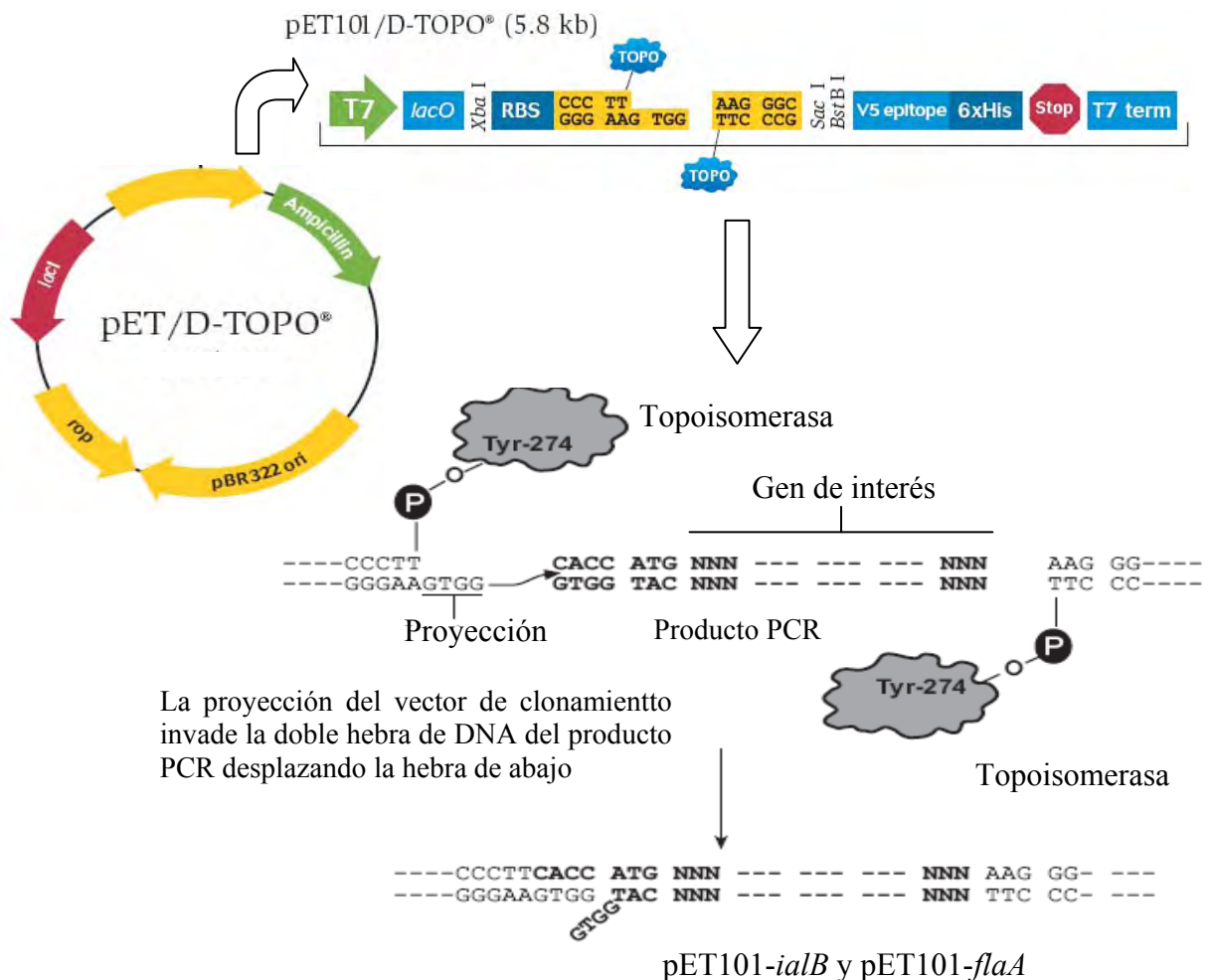
### **3.7.2. Purificación del amplicón desde el gel de agarosa**

Para purificar el amplicón de interés por la presencia de bandas inespecíficas, se utilizó el kit QUIAquick Gel Extraction (QUIAGEN), en donde el producto de PCR fue separado en un gel de agarosa de bajo punto de fusión. Luego, el fragmento de DNA elegido y observado al transiluminador, fue escindido del gel con la ayuda de hoja de bisturí nueva, y colocado en un eppendorf previamente pesado para luego determinar el peso del gel.

Se agregó 3 volúmenes de buffer QG a 1 volumen de gel (100 mg de gel equivalen a 100 µL), se incubó a 55°C por 5 a 10 minutos (mezclando en el vortex cada 2 minutos durante la incubación), hasta que el gel se haya disuelto completamente. Se verificó que el color de la mezcla sea amarillo que es indicativo de un pH de 7.5, que garantizó una eficiente adsorción del DNA a la membrana QUIAquick. Luego se centrifugó 1 minuto a 13000 g y se tomó el sobrenadante que fue colocado en una columna spin ubicada dentro de un eppendorf de 2 mL. Se centrifugó 1 minuto a 13000 g, se descartó el eluido y se adicionó a la columna 500 µL de buffer QG, se volvió a centrifugar por 1 minuto a 13000 g y se descartó el flujo. Se agregó 750 µL de buffer PE (que ya fue mezclado previamente con etanol absoluto) a la columna, se dejó incubando de 2 a 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 1 minuto a 13000 g. Se descartó el flujo y repitió la centrifugación por 1 minuto para descartar algún residuo de buffer PE. Se transfirió la columna a un eppendorf limpio y se le agregó al centro 50 µL de buffer EB, se incubó 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó 2 minutos a 13000 g.

### 3.7.3. Clonación de genes

Los genes de interés purificados se insertaron en el vector de clonamiento y expresión pET101/D-TOPO®, (Invitrogen, 2006). En este sistema los productos PCR fueron direccionalmente clonados agregando 4 bases (CACC) al oligonucleótido directo. La proyección en el vector de clonamiento (GTGG) invade la doble hebra del DNA, a nivel del extremo 5' del amplicón, desplazando la hebra de abajo ("bottom"), alineándose a las bases agregadas y estabilizando los productos de PCR en la correcta orientación con eficiencias iguales o mayores al 90% (Figura 1).



**Figura 1.-** Esquema de la clonación de los genes *ialB* y *flaA*. Detalles del vector de clonación y del polilinker de inserción de los productos de PCR

Antes del ensayo de clonamiento cada amplicón fue cuantificado por espectrofotometría para calcular los volúmenes a utilizar en la reacción, ya que debían estar en una proporción de radio molar de 0.5:1 a 2:1 el gen a clonar con el vector TOPO, respectivamente. Esta reacción se incubó por 40 minutos a temperatura ambiente y luego se colocó sobre hielo. Además para la reacción de ligación no hubo necesidad de usar DNA ligasa porque el vector porta la secuencia de una topoisomerasa que realiza esta función.

La reacción de clonación se realizó mezclando los siguientes componentes:

- Producto PCR fresco 1  $\mu$ L
- Solución salina 1  $\mu$ L
- Vector TOPO 1  $\mu$ L
- Agua estéril 3  $\mu$ L

pET101/D-TOPO® es un vector de expresión que fusiona una cola de 6 histidinas a la proteína recombinante para facilitar su purificación mediante cromatografía de afinidad a metal inmovilizado.

### **3.8. Transformación en *Escherichia coli* TOP10**

En el ensayo de transformación se utilizó un vial conteniendo 50  $\mu$ L de células *E. coli* One Shot TOP10 químicamente competentes (Chung y Miller, 1988), al que se le adicionó 3  $\mu$ L de la reacción de clonación, se mezcló suavemente dando vueltas con el tip sin pipetar. Se incubó en hielo 40 minutos. Se hizo un shock térmico llevando el vial a 42°C en baño maría por 30 segundos sin agitar, e inmediatamente se transfirió el vial sobre hielo. Luego se adicionó 250  $\mu$ L del medio SOC a temperatura ambiente. Se colocó el vial en agitación por 4 horas a 37°C y después se diseminó el cultivo sobre placas con Agar Luria Bertani conteniendo Ampicilina a una concentración de 100  $\mu$ g/mL de medio, y se incubó a 37°C por 12 a 16 horas, para la selección y análisis de las colonias transformantes (Invitrogen, 2006).

### 3.9. Análisis de las transformantes

Las transformantes seleccionadas por cada gen, se analizaron mediante PCR de colonia, para verificar el correcto clonamiento de los genes en el vector pET101/D-TOPO. Para cada colonia seleccionada se realizó PCR del gen (usando oligonucleótidos directo y reverso del gen) y PCR cruzado donde se utilizó el oligonucleótido directo del vector con el reverso del gen o al revés. Este tipo de PCR permitió determinar si el gen clonado se había insertado correctamente en marco de lectura.

Para la PCR se resuspendió parte de la colonia seleccionada en 100 µL de agua ultrapura, se centrifugó a 13000 g por 2 minutos, se descartó el sobrenadante y agregó 30 µL de agua ultrapura. Se llevó a ebullición por 5 minutos, se centrifugó 1 minuto a 13000 g y se tomó un volumen del sobrenadante como DNA molde para la reacción de PCR con la enzima AccuPrime™ Taq DNA polymerase High Fidelity (Invitrogen). Se prepararon reacciones de 25 µL con la siguiente proporción de reactivos:

- |   |                                 |
|---|---------------------------------|
| • 10X AccuPrime™ PCR Buffer II                          | 2.5 µL                          |
| • Oligonucleótido directo ( <i>ialB/flaA</i> /T7/T7)    | 0.6 µL/0.8 µL/0.5 µL/0.5 µL     |
| • Oligonucleótido reverso ( <i>ialB/flaA/iaB/flaA</i> ) | 0.7 µL/0.8 µL/0.7 µL/0.8 µL     |
| • Molde (DNA de colonia)                                | 3 µL                            |
| • AccuPrime™ Taq High Fidelity                          | 0.1 µL                          |
| • Agua ultrapura  | 18.1 µL/17.8 µL/18.2 µL/18.1 µL |

A todos los productos PCR obtenidos se les hizo una electroforesis en agarosa al 1%. Los clones que tenían inserto el gen de forma correcta, fueron cultivados y almacenados a -80 y -20°C en medio LB suplementado con glicerol al 15 y 50%.

### 3.10. Purificación de DNA plasmídico

Los clones seleccionados fueron cultivados a 37°C por 24 horas en caldo LB suplementado con Ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL de medio. Luego, las bacterias fueron sedimentadas por centrifugación y se realizó la extracción de plásmidos.



### **3.10.1. Purificación con PureLink™ Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen)**

Inicialmente, el kit fue reconstituido por adición de la RNasa A al buffer de resuspensión R3, así como 30 mL y 17 mL de etanol al 100% a los buffers de lavado W9 y W10, respectivamente.

Se centrifugó 5 mL de un cultivo de toda la noche de *E. coli* TOP10 ( $1-2 \times 10^9$  células), se descartó completamente el sobrenadante y el sedimento celular fue resuspendido en su totalidad en 250  $\mu$ L de buffer R3. Se adicionó 250  $\mu$ L de buffer de lisis L7, se mezcló lentamente invirtiendo el eppendorf tapado unas 5 veces e incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregó 350  $\mu$ L de buffer de precipitación N4, se mezcló por inversión hasta obtener una suspensión homogénea, se centrifugó a 13000 g por 10 minutos y el sobrenadante se depositó en una columna spin, la cual se metió dentro de un eppendorf de 2 mL. Se centrifugó a 13000 g por 1 minuto, se descartó el flujo eluido y se adicionó a la columna 500  $\mu$ L de buffer de lavado W10, se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente. Luego se centrifugó 1 minuto a 13000 g, se descartó el eluido y se agregó a la columna 700  $\mu$ L de buffer de lavado W9, se centrifugó 1 minuto a 13000 g, se descartó el flujo y nuevamente se vuelve a centrifugar 1 minuto más para remover algún residuo de buffer W9. En un eppendorf limpio se colocó la columna y adicionó al centro de la misma 75  $\mu$ L de buffer TE, se incubó 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugó 2 minutos a 13000 g para eluir el DNA plasmídico que luego fue almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Todas las muestras de DNA plasmídico obtenidas fueron cuantificadas al espectrofotómetro en celdas de cuarzo de 200  $\mu$ L. Además, se determinó la relación de  $A_{260}/A_{280}$  para establecer la pureza de la purificación. Finalmente, se realizó una electroforesis en agarosa al 1%, cargando una misma concentración de DNA en cada carril del gel, con la finalidad de determinar la integridad del DNA purificado.

### **3.10.2. Purificación con QIAprep® Miniprep (QUIAGEN)**

El kit fue reconstituido añadiendo 700  $\mu$ L de RNasa A a 70mL de buffer P1, 10  $\mu$ L de lyseblue se agregaron a 10 mL de buffer P1 y 220 mL de etanol absoluto a 55 mL de buffer PE.

Un sedimento celular obtenido de la centrifugación de 5 mL de un cultivo de toda la noche de *E. coli* TOP10, se resuspendió en 250 µL de buffer P1. Se adicionó 250 µL de buffer P2, se mezcló invirtiendo el eppendorf unas 6 veces hasta obtener una solución homogéneamente coloreada sin exceder los 5 minutos de incubación a temperatura ambiente. Se agregó 350 µL de buffer N3 y mezcló invirtiendo el eppendorf unas 6 a 10 veces hasta obtener una suspensión homogénea, se centrifugó a 13000 g por 10 minutos y el sobrenadante fue colocado en una columna spin, la cual se metió dentro de un eppendorf de 2 mL. Se centrifugó a 13000 g por 1 minuto, se descartó el eluido y se adicionó a la columna 500 µL de buffer PB. Luego se centrifugó 1 minuto a 13000 g, se descartó el flujo y se agregó a la columna 750 µL de buffer PE, se centrifugó 1 minuto a 13000 g, se descartó el flujo y nuevamente se vuelve a centrifugar 1 minuto más para remover algún residuo de buffer de lavado. La columna fue colocada en un eppendorf limpio y al centro de la misma se agregó 50 µL de buffer EB, se incubó 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugó 2 minutos a 13000 g para eluir el DNA plasmídico que luego fue almacenado a -20°C.

Todas las muestras de DNA plasmídico obtenidas fueron cuantificadas al espectrofotómetro en celdas de cuarzo de 200 µL. Además, se determinó la relación de  $A_{260}/A_{280}$  para establecer la pureza de la purificación. Finalmente, se realizó una electroforesis en agarosa al 1%, cargando una misma concentración de DNA en cada carril del gel, con la finalidad de determinar la integridad del DNA purificado.

### **3.11. Secuenciación de los genes *ialB* y *flaA***

Los genes *ialB* y *flaA* de *B. bacilliformis* de todos los clones que amplificaron con la PCR del gen y PCR cruzado, a los que luego se les hizo extracción de DNA plasmídico, fueron secuenciados usando como DNA molde el plásmido vector con el inserto correspondiente (pET101-*ialB*, pET101-*flaA*) en una reacción de PCR con el kit BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Del mismo modo se secuenció el amplicón obtenido de la cepa *B. clarridgeiae* al usar los oligonucleótidos del gen *ialB* de *B. bacilliformis*.

La reacción de secuenciación se realizó preparando la siguiente mezcla de reactivos:

- Terminator Ready Reaction Mix                      4  $\mu$ L
- Molde (plásmido pET101)                              5.8  $\mu$ L
- Oligonucleótido    0.2  $\mu$ L
- H<sub>2</sub>O ultrapura    0  $\mu$ L

Las temperaturas y tiempos para realizar las PCR de secuenciamiento con los genes *ialB* y *flaA* fueron:

1. Desnaturalización                      96°C    1 minuto.
2. Desnaturalización                      96°C    30 segundos.
3. Hibridación                              58°C    30 segundos.
4. Polimerización                          60°C    4 minutos (25 ciclos del paso 2- 4).
5. Pausa                                      4°C     $\infty$

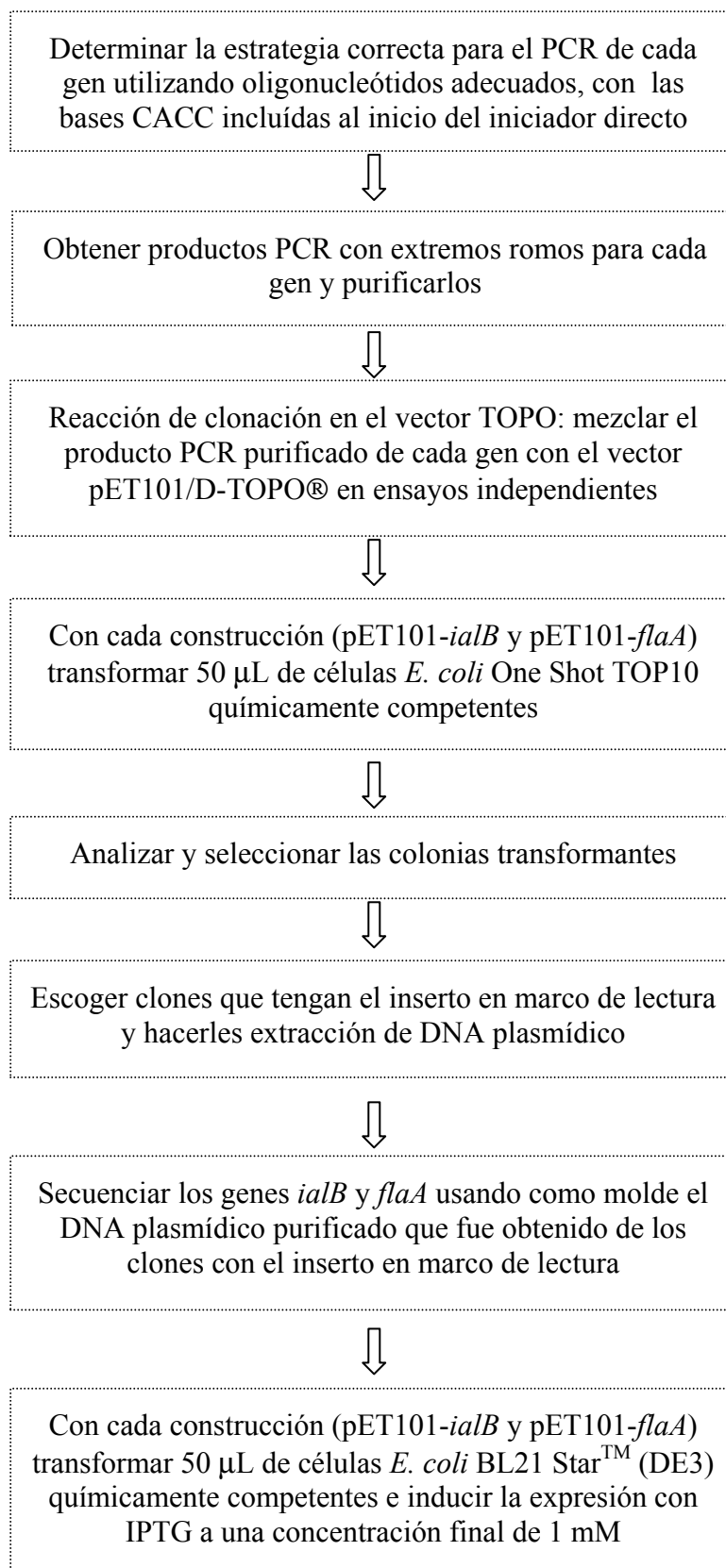
Para las reacciones con productos de menos de 600 pb se utilizó sólo una reacción ya sea con el diercto o reverso del vector, pero para amplicones de más de 600 pb se realizaron 2 reacciones de PCR por separado, es decir, una con el directo y otra con el reverso del vector. Los fragmentos secuenciados fueron comparados con las secuencias de los genes *ialB* y *flaA* disponibles en la base de datos del NCBI.

### **3.12. Expresión de las proteínas recombinantes IalB y FlaA en *Escherichia coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3)**

La cepa *Escherichia coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) (Invitrogen) se transformó de manera independiente con las construcciones pET101-*ialB* y pET101-*flaA* (Chung et al., 1988).

Sobre hielo se descongeló un vial de células *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3), y se agregó de 5 a 10 ng de DNA plasmídico contenidos en un volumen de 1 a 5  $\mu$ L, se mezcló suavemente dando vueltas con el tip sin pipetear e incubó sobre hielo por 30 minutos. Se sometió a shock térmico incubando el vial por 30 segundos a 42°C en baño maría sin agitar, e inmediatamente se transfirió el vial a hielo. Se agregó 250  $\mu$ L de medio SOC e incubó en agitación por 4 horas a 37°C.

La expresión de las proteínas recombinantes IalB y FlaA fueron inducidas con isopropil-tiogalactósido (IPTG) a una concentración final de 1 mM, para lo cual luego de la incubación todo el contenido del vial se vertió a 10 mL de caldo LB con Ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL y se incubó toda la noche en un shaker con agitación a 37°C. Unos 500 µL de este cultivo se inoculó a 10 mL de caldo LB con Ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL, se mantuvo en agitación por 2 a 3 horas hasta que alcanzó una  $A_{600}$  entre 0.5 a 0.8, luego se repartió el cultivo por igual en 2 tubos de 15 mL. A uno de los tubos se le adicionó IPTG, y se tomó de ambos una alícuota de 500 µL (tiempo cero) que fue centrifugada y el sedimento almacenado a -20°C, luego cada tubo fue incubado en agitación a 37°C por 4 a 6 horas, tomando cada hora, de cada uno de ellos una alícuota de 500 µL y procesándola igual que el tiempo cero. Este procedimiento permitió determinar el tiempo adecuado de máxima expresión; para ello, se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida de los extractos de células totales (PAGE-SDS) (Laemli, 1970; Frederick et al., 1997), previa cuantificación de las células a través del cálculo del peso húmedo (que se determinó por diferencia del peso del eppendorf con sedimento menos el peso del eppendorf vacío), agregando por cada miligramo de células 10 µL de buffer de carga de proteínas y de esta forma en cada carril del gel se cargó un mismo volumen de muestra (este procedimiento es equivalente a la determinación de proteínas previamente a la realización de la electroforesis) (Figura 2).



**Figura 2.-** Protocolo de clonación y expresión de los productos PCR de los genes *ialB* y *flaA*

### 3.13. Purificación de las proteínas recombinantes IalB y FlaA

Las dos proteínas recombinantes IalB y FlaA fueron expresadas como proteínas fusionadas con una cola de 6 histidinas, para facilitar su purificación por cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (IMAC). El método de IMAC se basa en la afinidad del imidazol de la histidina por el níquel quelado en una resina de Sepharosa (Crowe et al., 1996).

Una vez determinado el tiempo adecuado de incubación para obtener la máxima expresión, se realizó cultivos a gran escala, para lo cual se inoculó a 300 mL de caldo LB con Ampicilina unos 3 mL del cultivo de toda la noche de *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) transformadas e incubó en agitación a 37°C durante 2 a 3 horas en que se obtuvo una  $A_{600}$  de 0.5-0.8, luego se agregó 3 mL de IPTG 100 mM y siguió incubando el tiempo adecuado que permitió alcanzar la máxima sobre-expresión. Se realizaron varias centrifugaciones a 13000 g por 2 minutos y se obtuvo el sedimento celular de los 300 mL de cultivo.

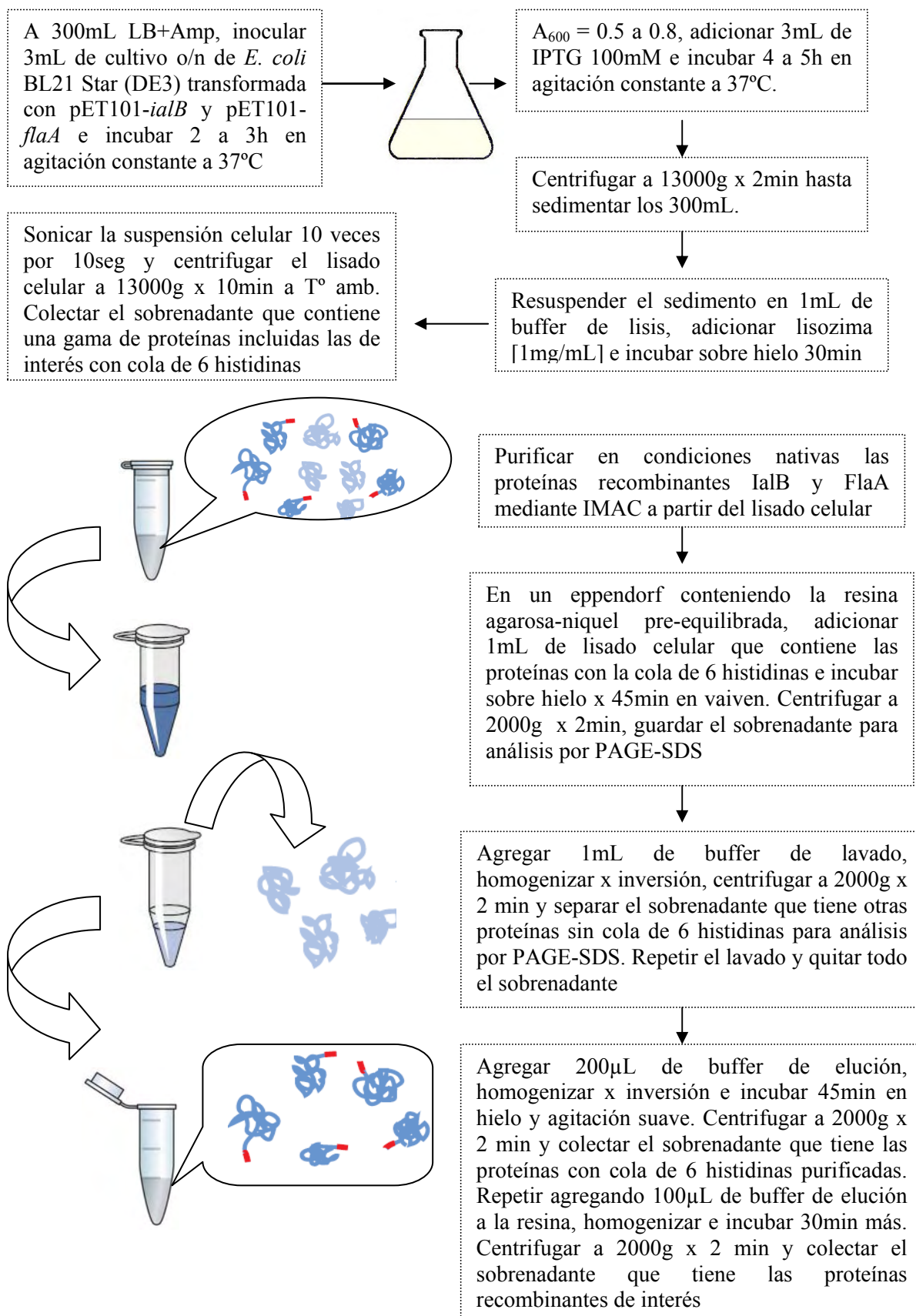
A partir de estos extractos crudos que sobre-expresaron las proteínas recombinantes IalB y FlaA se realizaron las purificaciones mediante cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (IMAC) bajo condiciones nativas (no denatürantes) que permiten purificar proteínas solubles, empleando para ello agarosa unida a Níquel ( $Ni^{2+}$ ). El protocolo seguido fue el recomendado en el boletín técnico Ni-NTA Spin HandBook (QUIAGEN).

El sedimento celular de los 300 mL de cultivo fue resuspendido en 1 mL de buffer de lisis (Tris 10 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM a pH 8.0), se adicionó lisozima a una concentración final de 1 mg/mL y se incubó sobre hielo por 30 minutos. La suspensión celular fue sometida a sonicación 10 veces por 10 segundos, dejando intervalos de 5 segundos y todo se realizó sobre hielo. Se centrifugó el lisado celular a 13000 g por 10 minutos a temperatura ambiente y en el caso que se observaba que el sobrenadante (lisado) no estaba claro se volvía a centrifugar por 3 a 5 minutos adicionales, luego se colectó el sobrenadante en un eppendorf de 2 mL. El sedimento que quedó y 20  $\mu$ L del sobrenadante fueron guardados a -20°C para el análisis mediante PAGE-SDS (Laemli, 1970; Frederick et al., 1997).

En un eppendorf se colocó 600  $\mu$ L de la mezcla agarosa-niquel previamente homogenizada, se centrifugó con la tapa abierta a 2000 g por 2 minutos y se descartó el sobrenadante. Se adicionó 1 mL de buffer de lisis y por inversión se homogenizó la agarosa-niquel con el buffer de lisis, luego se centrifugó con la tapa abierta por 2 minutos a 2000 g y se eliminó el sobrenadante, quedando pre-equilibrada la resina. Sobre la resina pre-equilibrada, se cargó 1 mL del sobrenadante obtenido luego del lisado celular que contenía la proteína con su cola de 6 histidinas y se homogenizó por inversión, colocando después el eppendorf en hielo y todo eso se puso por 45 minutos en agitación suave sobre una placa de un agitador vaiven. Se centrifugó 2 minutos a 2000 g y el sobrenadante fue guardado a -20°C para su análisis mediante PAGE-SDS.

Se agregó por las paredes del eppendorf 1 mL de buffer de lavado (Tris 10 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM a pH 8.0) a la resina y se homogenizó suavemente varias veces por inversión, se centrifugó 2 minutos a 2000 g y se guardó el sobrenadante a -20°C para el análisis con PAGE-SDS. Se volvió a repetir el paso de lavado una vez más tratando de tomar todo el sobrenadante que también fue almacenado a -20°C para el análisis con PAGE-SDS. Se adicionó 200  $\mu$ L de buffer de elución (Tris 10 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM a pH 8.0) homogenizando suavemente por inversión y se puso a incubar por 45 minutos en hielo y mantenido en agitación suave en un agitador vaivén. Se centrifugó 2 minutos a 2000 g y se colectó el sobrenadante, que es el eluido donde se esperaba encontrar los productos de expresión, y fue almacenado a -20°C para el análisis por PAGE-SDS. Se volvió a agregar 100  $\mu$ L de buffer de elución a la resina, se homogenizó e incubó por 30 minutos tal y como se hizo en la primera elución. Se centrifugó 2 minutos a 2000 g y se colectó el sobrenadante que fue almacenado a -20°C para el análisis con PAGE-SDS.

Todas las muestras almacenadas a -20°C fueron analizadas por electroforesis PAGE-SDS utilizando un gel concentrador al 5% y un resolutivo al 12% y como marcadores se usó lisozima y seroalbúmina bovina (BSA) a una concentración de 10  $\mu$ g/ $\mu$ L (Figura 3).



**Figura 3.-** Purificación de las proteínas recombinantes IalB y FlaA



### **3.14. Diálisis, concentración y cuantificación de las proteínas purificadas**

Todos los eluidos obtenidos se colocaron en forma independiente en bolsas de diálisis con porosidad de exclusión de 10,000 Da contra agua MilliQ, en agitación magnética y a 4°C. Se realizaron 3-4 cambios de la diálisis durante 24 horas. Después de la diálisis, se tomó una alícuota de 100 µL para cuantificar las proteínas siguiendo el método de Bradford para lo que se hizo una curva patrón con seroalbúmina bovina (Bradford, 1976). Finalmente las proteínas recombinantes IalB y FlaA fueron congeladas a -20°C y liofilizadas para concentrarlas al máximo.

### **3.15. Inmunización de conejos con las proteínas recombinantes purificadas de *B. bacilliformis***

Conejos de raza Nueva Zelanda adultos de aproximadamente 2 Kg de peso corporal fueron adquiridos comercialmente del Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú. El esquema de inoculaciones fue diseñado teniendo en consideración los siguientes puntos:

- Cantidad de proteína recombinante obtenida. Se usó dosis de 200 µg en cada inmunización que se inyectaron el día 0, 10 y 17 (Figura 4).
- Tiempo de disponibilidad para realizar el tratamiento. Se planificó un mes para el ensayo.
- Disponibilidad de animales. Un conejo hembra fue tratado con proteína IalB, 2 conejos hembras con FlaA, y un conejo macho usado como control recibió sólo PBS.

El día cero se hizo una sangría de pre-inmunización, las sangrías parciales fueron realizadas a los días 10, 17 y la sangría final el día 24 del tratamiento.

#### **3.15.1. Preparación de las proteínas para la inoculación**

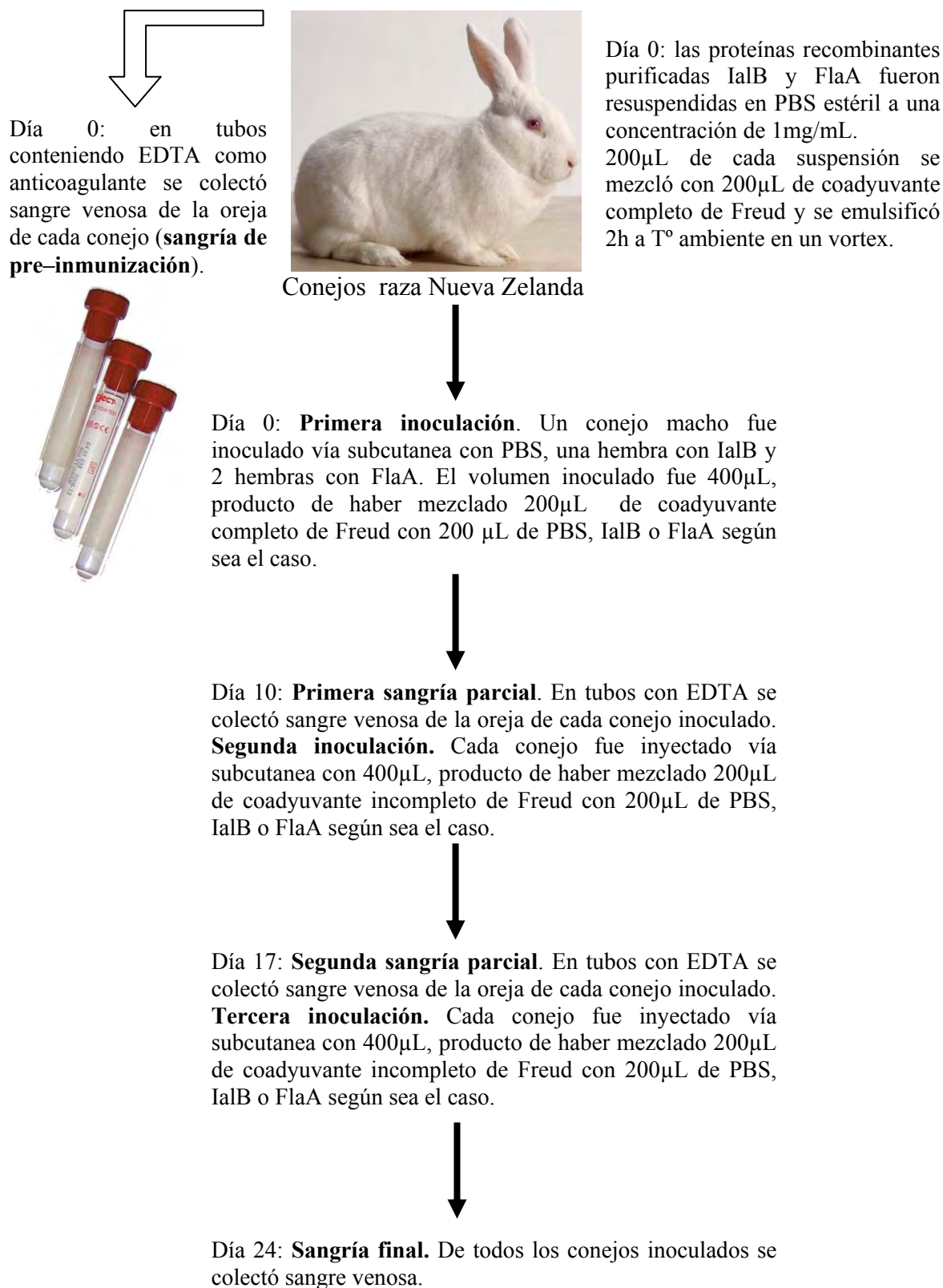
Las proteínas recombinantes liofilizadas (antígeno) fueron resuspendidas en PBS estéril para preparar soluciones a una concentración de 1 mg/mL. La solución fue alicuotada y conservada a -20°C hasta su uso. La primera dosis de antígeno que recibieron los animales fue preparada con Coadyuvante completo de Freud (Sigma-Aldrich, USA), y la segunda y tercera dosis con coadyuvante incompleto de Freud

(Sigma-Aldrich, USA). En un criovial de 2 mL se mezcló 1 volumen de la solución de proteína con 1 volumen de coadyuvante, y la emulsificación se realizó en un vortex a temperatura ambiente durante 2 horas. Todas las dosis fueron administradas vía subcutánea en el dorso del animal, luego de limpiar cuidadosamente la zona de inoculación con alcohol yodado. El inóculo fue aplicado con una jeringa de tuberculina teniendo cuidado de no inyectar aire junto con la dosis.

### **3.15.2. Sangrías**

Muestras de sangre venosa de los conejos fueron obtenidas de la vena marginal de las orejas, el día 0, 10, 17 y 24. Para ello, las venas fueron dilatadas con xilol, luego de comprobar visualmente la dilatación, se limpió exhaustivamente con alcohol yodado para retirar el xilol de la piel del animal. La punción de la vena se realizó con una aguja hipodérmica N° 21G (corta), y se dejó fluir la sangre por las paredes de un tubo plástico estéril de 15 mL para evitar la hemólisis. La sangre fue recogida en tubos que contenían una solución de EDTA como anticoagulante (Figura 4).

Las muestras de sangre fueron colocadas en tubos de centrifuga apropiados, y centrifugados a 2000 g durante 15 minutos para sedimentar las células sanguíneas y resto celular. Luego el plasma (sobrenadante) fue separado, y conservado a -20°C en alícuotas.



**Figura 4.-** Esquema del protocolo de inmunización de conejos con las proteínas recombinantes

### 3.16. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay)

Algunas alícuotas de plasma correspondientes a cada día de sangría de cada uno de los conejos inoculados, fueron empleadas para obtener el título de anticuerpos a través de la cuantificación de la fracción de IgG por un ensayo de ELISA (inmunoabsorción ligado a enzima) directo usando un anticuerpo específico anti-IgG de conejo preparado en cabra y conjugado con peroxidasa de rábano (Antigenix America Inc., USA).

Los reactivos para la detección usando peroxidasa de rábano (HRP) fueron:

- Cabra Anti-Rabbit IgG-HRP, 1 mL.
- IgG de conejo (Antigenix America Inc., USA).
- 3,3', 5,5'-Tetrametilbencidina (TMB).
- Peróxido de hidrógeno, solución al 30%.
- Ácido sulfúrico 1 M.

Soluciones:

- Buffer carbonato de sodio, 50 mM, pH 9.6.
- PBS-T (PBS conteniendo 0.05% Tween-20).
- Seroalbúmina bovina (BSA) al 3% en PBS-T.
- Acetato de sodio, 0.1 M.

Todas las soluciones se prepararon con agua milli-Q, y se esterilizaron por filtración. Como se trabajó con el sistema de detección de HRP (horseradish peroxidase), los buffers no debían contener azida de sodio.

En tubos eppendorf se prepararon diluciones seriadas de los plasmas de los conejos inoculados. Se usó como diluyente el buffer carbonato de sodio. La dilución inicial fue de 1/5 (200  $\mu$ L de plasma fueron mezclados con 800  $\mu$ L de buffer carbonato de sodio). Todos los tubos fueron mezclados en vortex y mantenidos en hielo (4°C).

El esquema de las diluciones seriadas de los plasmas (IgG) para realizar la titulación de anticuerpos en los plasmas de los animales se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1.-** Diluciones seriadas del plasma de los conejos inoculados

Dilución de suero	Volumen de carbonato de sodio (μL)	Volumen de la dilución previa (μL)
1:10	500	500 de 1:5
1:20	500	500 de 1:10
1:40	500	500 de 1:20
1:80	500	500 de 1:40
1:160	500	500 de 1:80
1:320	500	500 de 1:160
1:640	500	500 de 1:320
1:1280	500	500 de 1:640
1:2560	500	500 de 1:1280
1:5120	500	500 de 1:2560
1:10240	500	500 de 1:5120
1: 20480	500	500 de 1:10240

Como control del ELISA para determinar las posibles uniones inespecíficas del anti-IgG de conejo, preparado en cabra y conjugado con peroxidasa de rábano, se depositó en algunos pocillos 200 μL buffer carbonato de sodio y se le enfrentó al anti-IgG de conejo.

Asímismo se utilizó IgG comercial de conejo para evaluar la calidad del anti-IgG empleado. Se preparó una dilución de 1/1000 μL del anticuerpo IgG de conejo, utilizando como diluyente el PBS-T. Luego, se añadió 200 μL de esta dilución a un pocillo, y se le enfrentó al anti-IgG de conejo.

En cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos se colocó 200 μL de cada una de las diluciones realizadas. Para permitir la unión de los anticuerpos a la placa, esta fue tapada e incubada durante 3 horas a temperatura ambiente o toda la noche (“overnight”) a 4°C. Los anticuerpos no unidos fueron retirados al lavar la placa 3 veces con 200 μL de PBS-T cada vez. El PBS-T fue añadido por las paredes de los pocillos para evitar despegar los anticuerpos unidos. Para eliminar el PBS-T, las placas fueron invertidas sobre papel absorbente, en todo momento se evitó la contaminación cruzada entre las diluciones.

Los sitios de adsorción libres fueron bloqueados añadiendo a cada pocillo 300 μL de 3% BSA/PBS-T. Para ello, las placas fueron incubadas a temperatura ambiente

durante 1 hora. Luego los pocillos fueron lavados 2 veces con 300  $\mu$ L de PBS-T en cada vez.

Se preparó una dilución 1:200 del anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con HRP. Como diluyente se usó el PBS-T. Luego, se añadió 200  $\mu$ L de esta dilución a cada pocillo, y la placa se tapó e incubó durante 3 horas a 37°C o durante toda la noche a 4°C.

El exceso de anti-IgG de conejo-HRP fue eliminado y se lavó la placa 2 veces con 200  $\mu$ L de PBS-T.

Se preparó una solución de sustrato, para lo cual se disolvió 0.1 mg de TMB en 100  $\mu$ L de dimetil sulfóxido (DMSO). Se añadió 9.9 mL de acetato de sodio 0.1 M, y se filtró en papel Whatman N°1. Finalmente, se añadió peróxido de hidrógeno para tener una concentración final de 0.01%.

Se añadió 100  $\mu$ L de la solución de sustrato a cada pocillo. La placa se tapó e incubó a temperatura ambiente durante 10 a 60 minutos. La reacción de la enzima sobre el sustrato daba una coloración azul. La reacción fue detenida añadiendo 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M.

Las absorbancias fueron leídas a 450 nm cuando la reacción fue detenida con la solución de ácido sulfúrico, y a 650 nm si la reacción no se detuvo.

El cálculo del título de anticuerpos del suero (IgG) se realizó graficando la absorbancia a 450 nm vs la dilución del suero. Gráficamente se pudo establecer el punto de inflexión de la curva para cada dilución trabajada y el promedio de las mismas es lo que correspondió al título, lo que fue equivalente a la determinación del punto utilizando un software con un modelo logístico (Software OriginPro 7.5).

### **3.17. Western Blot**

Una vez cuantificadas las IgG presentes en el plasma de los conejos inoculados, se realizó un western blot para ver si estas IgG eran específicas para las proteínas recombinantes IalB y FlaA puras, ya que este método se basa en el reconocimiento

específico con una fuerte afinidad de unión entre el antígeno (proteína inmovilizada IalB o FlaA) y el anticuerpo (IgG anti-IalB o IgG anti-FlaA).

Para conseguir resultados óptimos, aproximadamente 100 ng de cada una de las proteínas recombinantes purificadas fueron corridas en carriles independientes, en un gel de poliacrilamida al 12% y luego transferidas eficientemente desde el gel hacia la membrana de nitrocelulosa, usando 80 voltios por 3 horas con agitación magnética y 4°C. La membrana fue teñida con una solución de Rojo de Ponceau durante 5 minutos y luego se destiñó con agua. Se bloqueó la membrana con solución de bloqueo (BLOTTO: en 1L de PBS se adicionó 50 g de leche desnatada en polvo, 1 mL de Tritón X-100 y 1 mL de azida sódica al 10%) con agitación durante 3 horas. Se lavó la membrana con PBS-Tween 20 al 0.1%, dos veces durante 5 minutos cada vez. Se añadió 100 µL de una dilución de 1/200 del anticuerpo primario (IgG anti-IalB o IgG anti-FlaA presente en el plasma), e incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación rotatoria. La membrana fue lavada 3 veces con PBS-tween 20 durante 5 minutos cada vez en agitación. Se incubó la membrana con 100 µL de una dilución de 1/1000 del segundo anticuerpo comercial (anti-IgG para conejo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Luego la membrana fue lavada 5 veces en PBS-tween 20 durante 5 minutos cada vez. La detección de la proteína fue realizada utilizando el sustrato colorimétrico 3'3 diaminobenzidina (DAB) y peróxido de hidrógeno.

En paralelo con el fin de verificar el poder inmunógeno de las IgG obtenidas luego de la inoculación de las proteínas recombinantes, se realizó el mismo experimento descrito anteriormente, pero en lugar de haber cargado proteína recombinante purificada IalB y FlaA en dos pocillos independientes del PAGE-SDS, se colocó 20 µL de lisado de proteínas totales de *Bartonella bacilliformis* a cada pocillo. El sedimento fue obtenido de la cosecha de 3 tubos bien crecidos de cultivos frescos de *Bartonella bacilliformis*, el que se resuspendió en buffer de carga previa cuantificación de las células a través del cálculo del peso húmedo, agregando por cada miligramo de células 10 µL de buffer de carga de proteínas. Como controles negativos se usó carriles cargados con BSA y lisado de proteínas totales de *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) nativa para el primer y segundo experimento respectivamente.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Cultivo de las cepas de *Bartonella*

Todas las cepas estándares excepto *B. bacilliformis* al inicio crecían formando una película algo grasosa sobre la fase líquida y sólida, la cual iba desapareciendo poco a poco en los subcultivos sucesivos y sólo se volvía a observar en subcultivos de más de 2 a 3 semanas de incubación.

La cepa de *B. henselae* CIP 103737 creció entre los 7 a 9 días de cultivo, formando una capa a manera de película llena de colonias de morfología heterogénea, con un color grisáceo blanquecino, medianas a muy pequeñas, rugosas y no adherentes al medio.

Las colonias de la cepa *B. vinsonii* subsp. *vinsonii* CIP 103738 empezaron a evidenciarse entre los 3 y 5 días de cultivo, formando colonias grandes y medianas, todas blanquecinas grisáceas, cremosas y húmedas, en forma tupida sobre la fase sólida a manera de capa, así como colonias secas muy diminutas fuertemente adheridas a la superficie del agar.

La cepa de *B. elizabethae* CIP 103761, comenzó a crecer entre los 2 y 4 días de cultivo, formando una capa homogénea y abundante de grandes colonias adherentes, con morfología irregular, brillosas, húmedas y cremosas. Algunos cultivos tenían colonias medianas y pequeñas, algo grisáceas y húmedas, y otros una capa más tenue de colonias secas no tan cremosas.

*B. clarridgeiae* CIP 104772 fue una cepa de crecimiento más lento, su crecimiento fue evidenciado entre los 14 a 18 días de cultivo, formaba colonias diminutas muy juntas, húmedas, ligeramente hundidas en el agar. El crecimiento no era abundante y en general muy parecido a *B. bacilliformis*.

*B. bovis* CIP 106692 formó colonias secas, muy diminutas, juntas a manera de capa bien adheridas al agar. El crecimiento fue observado entre los 12 y 14 días de cultivo. El crecimiento fue pobre y en ciertos frascos de cultivo, sobre la capa antes descrita, se observó colonias medianas esparcidas y algo cremosas.

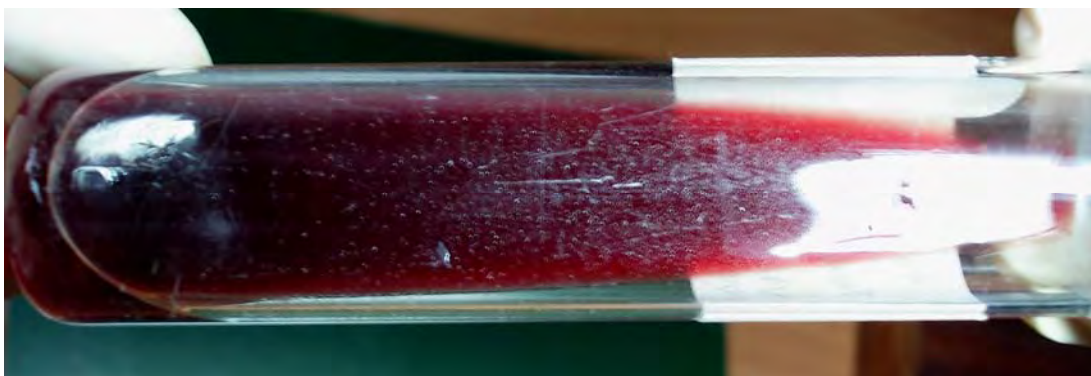


La fase líquida de todas las cepas antes descritas se tornaba bastante turbia, así como rojiza a los 12 días de cultivo, aproximadamente. Esto ocurre como consecuencia de la lisis de los eritrocitos de caballo.

Las cepas de *B. bacilliformis* (CIP 77.27, CIP 57.17, CIP 57.18, CIP 57.19, CIP 57.20 y 35096) tuvieron rangos de crecimiento variable que fluctuaron entre los 15 y 45 días de incubación, presentando en algunos casos crecimiento abundante en toda la superficie sólida del medio bifásico, y en otros casos, escasas colonias esparcidas sobre el agar sangre. Las colonias por lo general eran pequeñas, de borde entero, puntiformes y translúcidas, sin embargo no en todos los cultivos se observó características culturales homogéneas, ya que en algunos frascos de cultivo se vió sólo colonias muy pequeñas a manera de gotas de rocío, y en otros frascos, estas colonias puntiformes estaban junto a otras colonias ligeramente más grandes, blanquecinas, planas, algo cremosas y un poco adheridas al agar. Entre todas las cepas cultivadas sólo las cepas CIP 77.27 (Figura 5) y CIP 57.18 (Figura 6) fueron las que crecieron en un periodo más corto, a los 15 - 20 días de incubación, siendo a la vez la cepa CIP 57.18 la que tuvo un crecimiento más abundante y la que facilitó conseguir un mejor sedimento celular.

Inicialmente, sólo en los cultivos de *B. bacilliformis*, como fase líquida del medio bifásico se utilizó caldo Triptosa enriquecido con 15% de plasma de carnero; sin embargo, debido a la necesidad de tener que mantener por varias semanas las cepas en incubación, se presentó el problema de precipitación del plasma en la fase líquida que originaba la formación de grumos y cierta coagulación que interferían con el adecuado crecimiento y la cosecha de las células de *B. bacilliformis*, motivo por el que se empezó a utilizar como fase líquida el caldo BHI.

En la fase líquida de todos los cultivos de *B. bacilliformis* nunca se observó demasiada turbidez, por el contrario, siempre se mantenían de color amarillo ligeramente opaco por el crecimiento celular, sin hemólisis de los eritrocitos y sólo se tornaban marrón cuando los cultivos tenían más de 5 semanas y era producto de muerte celular de los eritrocitos de carnero.



**Figura 5.-** Cultivo de 20 días de la cepa patrón *B. bacilliformis* CIP 77.27. Se observan colonias a manera de gotas de rocío distribuidas uniformemente sobre la superficie del Agar Columbia suplementado con 10% de paquete celular de sangre de carnero.



**Figura 6.-** Cultivo de 15 días de la cepa estándar *B. bacilliformis* CIP 57.18. Las colonias de borde entero, puntiformes conforme pasan más días de incubación no incrementan en tamaño pero si en número, cubriendo mejor la superficie sólida.

Por otro lado, se realizaron algunos ensayos en paralelo utilizando en la preparación de los medios de cultivo para *B. bacilliformis*, sangre de carnero desfibrinada y frascos de cultivo celular descartables con tapas roscas con filtro (que generalmente se usan para el crecimiento de células en suspensión). Con estos materiales, el costo económico de los cultivos fue mayor, pero se consiguieron mejores resultados ya que se observó presencia de crecimiento tenue entre los 5 a 7 días de incubación con las cepas CIP 77.27 y CIP 57.18, con el resto de cepas, el crecimiento ocurrió entre los 15 a 20 días. Esta mejora del crecimiento celular quizá se debió al uso de sangre desfibrinada, y mejor aireación conseguida con los filtros presente en los frascos de cultivo. Luego, por motivos de presupuesto del proyecto, se tuvo que prescindir de su utilización y estandarizar todo el proceso de cultivo con tubos de ensayo de vidrio y sangre de carnero recogida en citrato de sodio como anticoagulante.

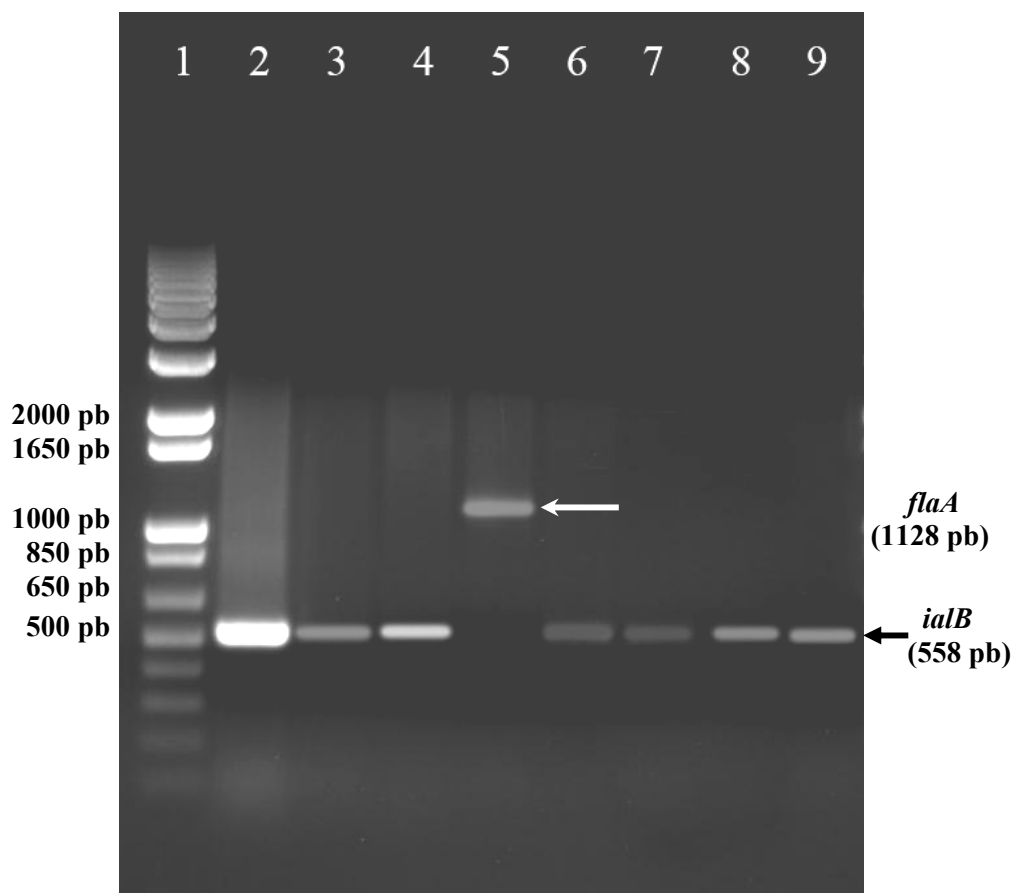
Todos los cultivos fueron realizados con extremo cuidado, sobre todo en lo concerniente a la siembra, para evitar contaminar las cepas entre ellas, las condiciones de esterilidad y limpieza fueron cuidadosamente atendidas durante la preparación de medios y materiales empleados, así como, de la cabina de flujo laminar e incubadora. En general, todo este cuidado fue debido a que los cultivos de *Bartonella* tienen mucha facilidad de ser contaminados por otras bacterias (*Pseudomonas* sp., *Streptococcus* sp. etc), levaduras y hongos ambientales. Esto ocurre porque los medios utilizados en el cultivo de *Bartonella* son muy enriquecidos y por el tiempo prolongado de los cultivos lo cual incrementa el riesgo de contaminación. Por este motivo, cuando se observaba en algún frasco de cultivo, la presencia de colonias extrañas o de características diferentes a lo descrito para las cepas de *Bartonella*, los cultivos fueron desechados.

#### **4.2. Aislamiento de DNA genómico**

Antes de realizar las extracciones de DNA genómico de las bacterias se verificó que las cepas correspondieran a la especie *B. bacilliformis*. Para lo cual, a partir de colonias de cada una de las cepas de *B. bacilliformis* se detectó el gen *ialB* por PCR. Las células empleadas para cada PCR de colonia se cosecharon de 2 tubos de cultivo de 20 - 25 días de incubación. Como el cultivo de la cepa CIP 57.18 permitió cosechar más bacterias entonces se realizó un ensayo con los oligonucleótidos del gen *flaA* de *B. bacilliformis*, para evaluar preliminarmente los posibles resultados que se obtendrían con el DNA genómico de las extracciones. Hasta este momento, según las investigaciones realizadas en relación al diagnóstico y detección específica por PCR de este patógeno, el gen *ialB* era un gen de gran utilidad por ser específico y encontrarse únicamente en *B. bacilliformis*, además se había demostrado que otras especies del género, y otras bacterias filogenéticamente relacionadas a *Bartonella* carecían del gen *ialB* (Padilla y Ventura, 2003).

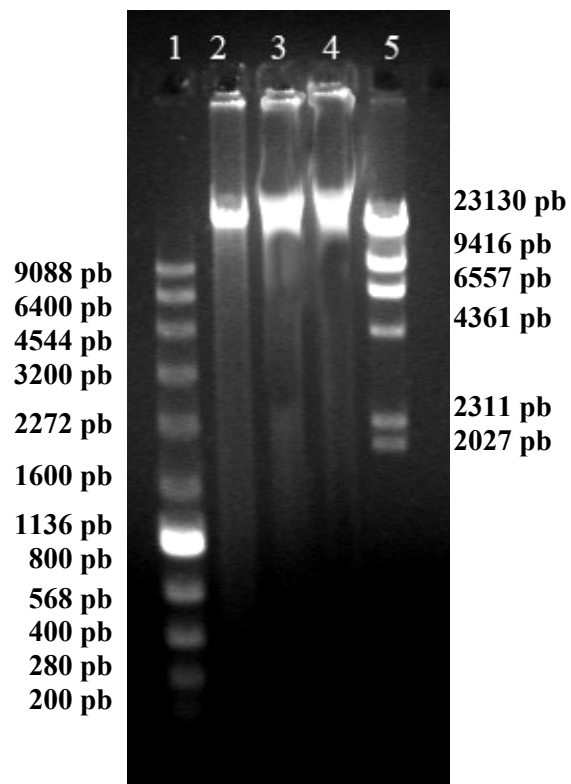
Todas las cepas de *B. bacilliformis* estudiadas amplificaron correctamente el gen *ialB* (Figura 7), observando en el gel de agarosa al 1% un producto de PCR de aproximadamente 558 pb que coincide con el tamaño reportado para el gen *ialB* de *B. bacilliformis*. De igual modo la cepa CIP 57.18 amplificó el gen *flaA* ya que el amplicón obtenido en el gel se visualizó como una banda de aproximadamente 1128

pb (Figura 7). La amplificación de diferentes genes usando la misma muestra de DNA indica una buena calidad del DNA molde.

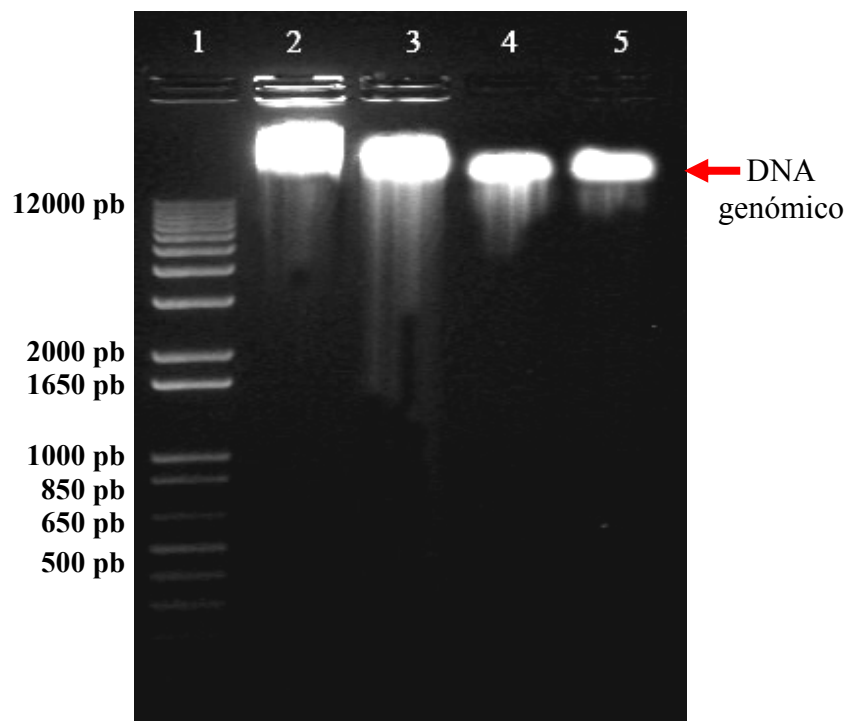


**Figura 7.-** Amplificación de los genes *ialB* y *flaA* a partir de colonias de las cepas de *Bartonella bacilliformis*. Carriles: (1) marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), (2) gen *ialB* de la cepa CIP 57.18, (3) gen *ialB* de la cepa CIP 57.17, (4) gen *ialB* de la cepa CIP 77.27, (5) gen *flaA* de la cepa CIP 57.18, (6 y 7) gen *ialB* de la cepa 35096, (8) gen *ialB* de la cepa CIP 57.19 y (9) gen *ialB* de la cepa CIP 57.20. Se cargó 10 uL de producto de PCR y 5 µL de marcador. La flecha blanca señala la banda que corresponde al amplicón del gen *flaA* de aproximadamente 1128 pb, y la flecha negra indica las bandas correspondientes a los productos de PCR del gen *ialB* con un peso molecular de 558 pb.

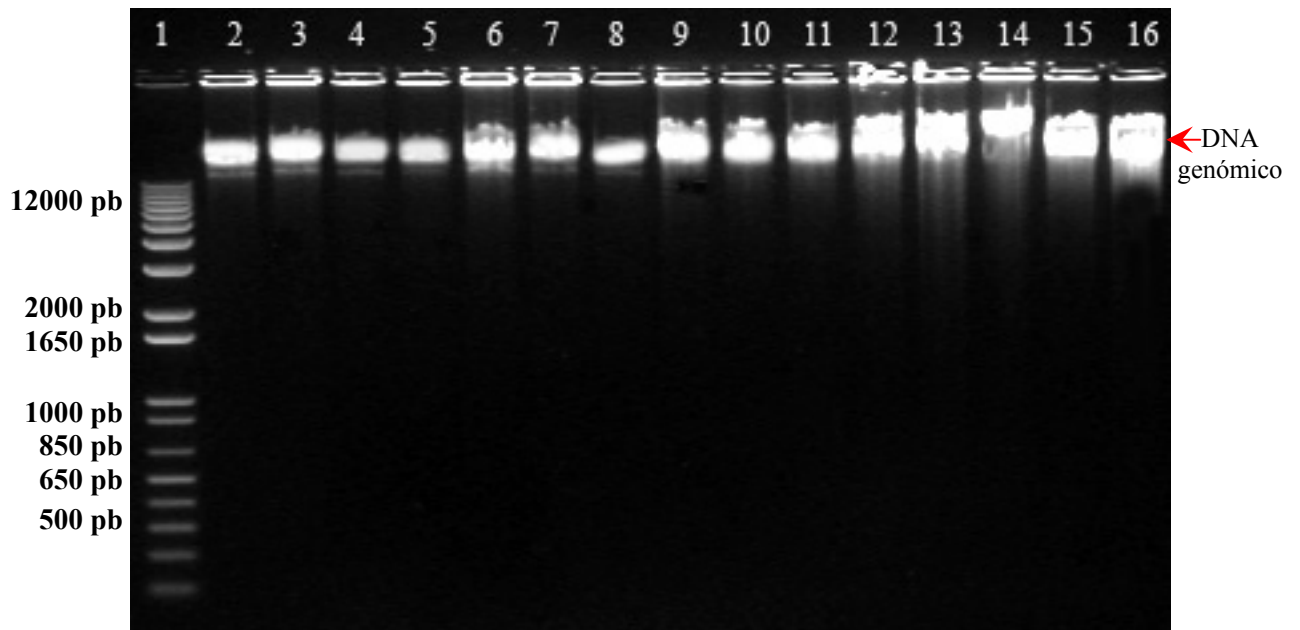
El DNA genómico de todas las especies de *Bartonella* estudiadas en este trabajo fue extraído con éxito, observando en los geles de agarosa al 1% la presencia de una única banda de alto peso molecular (Figura 8, 9 y 10), lo cual reflejó la pureza e integridad de cada DNA genómico obtenido.



**Figura 8.-** DNA genómico de las cepas de *Bartonella bacilliformis*. Carriles: (1) marcador de peso molecular en el rango de 200 a 9088 pb, (2) cepa CIP 57.17, (3) cepa CIP 57.19, (4) cepa 35096 y (5) marcador en rango de 125 a 23,130 pb.



**Figura 9.-** DNA genómico de las cepas de *Bartonella bacilliformis*. Carriles: (1) marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), (2) cepa CIP 57.18, (3) cepa CIP 77.27, (4) cepa 35096 y (5) cepa CIP 57.20. La flecha indica las muestras de DNA genómico.

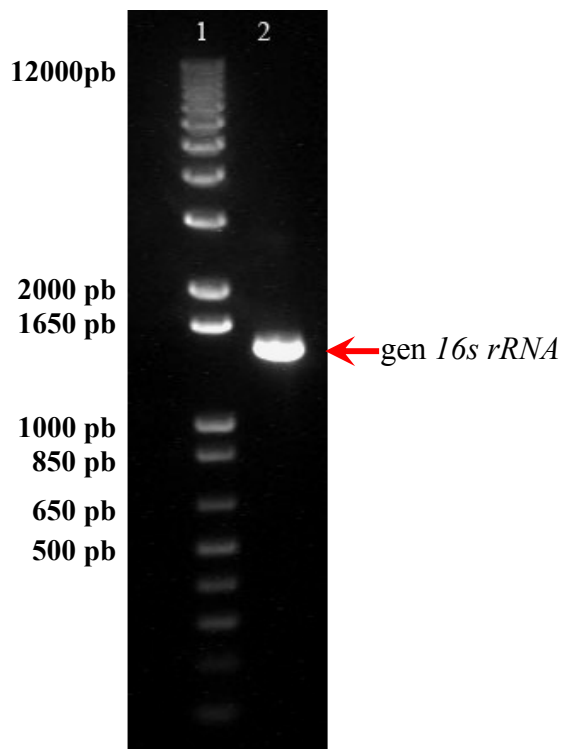


**Figura 10.-** DNA genómico de diferentes especies del género *Bartonella*. Carriles: (1) marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), (2-4) *B. clarridgeiae* CIP 104772, (5 y 8) *B. bovis* CIP 106692, (6-7 y 11) *B. vinsonii* subsp. *vinsonii* CIP 103738, (9-10 y 12) *B. elizabethae* CIP 103761 y (13-16) *B. henselae* CIP 103737. La flecha indica las muestras de DNA genómico.

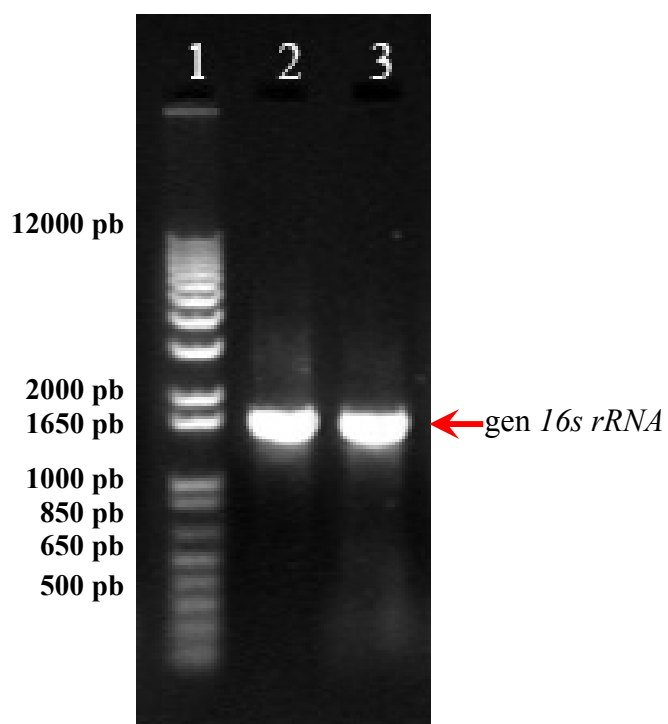
#### 4.3. Amplificación y secuenciación del gen *16S rRNA*

Después de verificar la calidad (integridad y pureza) de los DNA genómicos de las cepas de *B. bacilliformis* y las otras 5 especies de *Bartonella*, estos fueron utilizados como molde para amplificar por PCR el gen *16S rRNA*. El objetivo de este ensayo fue verificar que los DNA genómicos obtenidos correspondían en forma inequívoca a las cepas cultivadas, y descartar cualquier problema de contaminación.

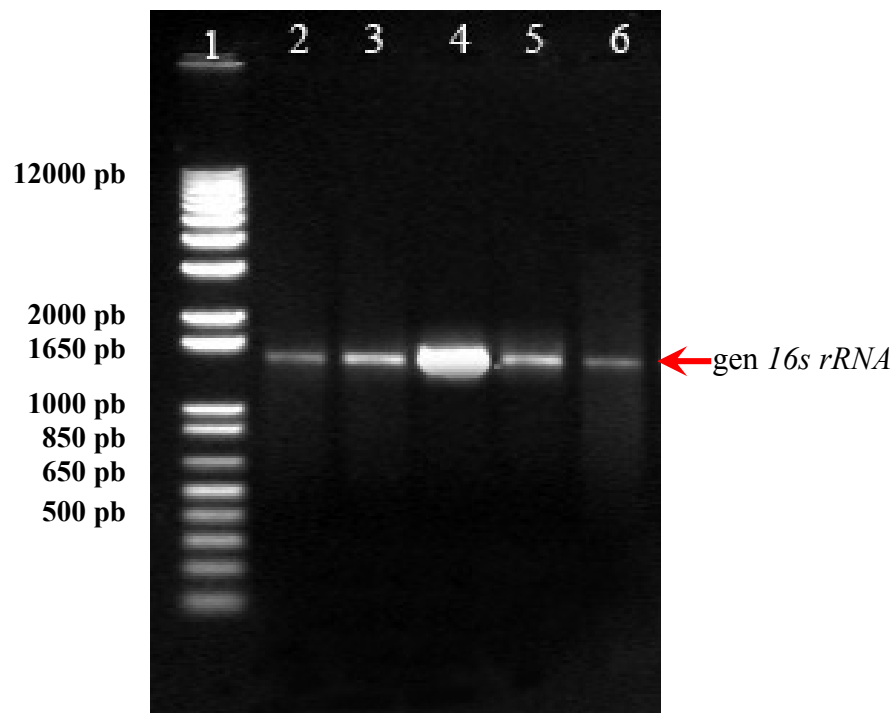
Los productos de PCR del gen *16S rRNA* corridos en geles de agarosa al 1% fueron observados como una sola banda de un peso molecular aproximado a 1471 pb (Figuras 11, 12 y 13).



**Figura 11.-** Amplificación por PCR del gen *16S rRNA* de *B. bacilliformis*, a partir de DNA genómico. Carriles: (1) marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen) y (2) cepa CIP 57.18. La flecha indica el amplicón del gen *16S rRNA*.



**Figura 12.-** Amplificación por PCR del gen *16S rRNA* a partir de DNA genómico. Carriles: (1) marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), (2) *B. clarridgeiae* CIP 104772 y (3) *B. bacilliformis* CIP 57.18. La flecha indica los productos PCR del gen *16S rRNA*.



**Figura 13.-** Amplificación por PCR del gen *16S rRNA* a partir de DNA genómico. Carriles: (1) marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), (2) *B. bovis* CIP 106692, (3) *B. vinsonii* subsp. *vinsonii* CIP 103738, (4) *B. clarridgeiae* CIP 104772, (5) *B. elizabethae* CIP 103761 y (6) *B. henselae* CIP 103737. La flecha indica los productos PCR del gen *16S rRNA*.

Luego los productos de PCR fueron purificados separando el amplicón de los reactivos de la PCR que no hayan reaccionado. Los amplicones puros del gen *16S rRNA* fueron usados como molde en las reacciones de secuenciación. Basados en el tamaño del gen *16S rRNA* es que se hicieron 2 reacciones de PCR de secuenciación independientes, una con el oligonucleótido reverso 1510R y la otra con el oligonucleótido directo 8F, utilizando en ambos casos la temperatura de hibridación de 55°C.

Las secuencias obtenidas fueron editadas manualmente utilizando el programa BioEdit (Hall, 1999), a partir del cual se copiaron en formato FASTA. Las secuencias nucleotídicas editadas fueron introducidas de una en una, en el link BLAST (Basic Local Alignment Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) del NCBI y fueron alineadas empleando los algoritmos blastn y megablast, con las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank para cada gen *16S rRNA*. Con los



porcentajes de identidad obtenidos se tuvo la certeza que las cepas eran las correctas y estaban puras.

Debido al gran tamaño del gen *16S rRNA* se realizó la secuenciación para ambas cadenas del amplicón. Antes de realizar los alineamientos en BLAST se buscó la secuencia consenso entre las dos secuencias nucleotídicas obtenidas, una con el primer directo y la otra con el reverso del gen *16S rRNA*. Para conseguir la secuencia consenso se utilizó el programa CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>).

Con las secuencias del gen *16S rRNA* de *B. bacilliformis* se obtuvo porcentajes de identidad de 98% (*B. bacilliformis* CIP 57.17 y *B. bacilliformis* CIP 57.18) y 99 % (*B. bacilliformis* CIP 57.19, *B. bacilliformis* CIP 57.20, *B. bacilliformis* CIP 57.27 y *B. bacilliformis* 35096) al ser comparados y alineados con la secuencia del gen *16S rRNA* de *B. bacilliformis* ATCC 35685 (N° de accesoión M65249) depositado en el GenBank (Figura 14). Al alinear el amplicón de *B. clarridgeiae* CIP 104772, el porcentaje de identidad resultante fue de 95% al ser alineados con las secuencias parciales del gen *16S rRNA* de la cepa *B. clarridgeiae* M9HN-SHQ (N° de accesoión EU571939) y la cepa *B. clarridgeiae* (N° de accesoión AB292603). Con el producto PCR de *B. vinsonii* subsp. *vinsonii* CIP 103738 se tuvo 96% de identidad al alinearse con la secuencia parcial del gen *16S rRNA* de *B. vinsonii* ATCC VR-152 (N° de accesoión M73230). En cambio los porcentajes de identidad para *B. henselae* CIP 103737, *B. bovis* CIP 106692 y *B. elizabethae* CIP 103761 fueron menores al 90%. En general, con este análisis se verificó que las cepas de *Bartonella* trabajadas realmente corresponden a sus especies descritas. Los porcentajes menores al 90% indicarían que la secuencia consenso quizá no fue editada y limpiada adecuadamente necesitando realizar una nueva reacción de secuenciación agregando un molde de DNA de mayor concentración.

Se realizaron alineamientos múltiples con las secuencias consenso del gen *16S rRNA* de todas las cepas trabajadas de *B. bacilliformis* (Figura 14) y con las secuencias consenso de todas las especies de *Bartonella* utilizadas, que presentaron porcentajes de identidad mayores al 90% (Figura 15). Para estos alineamientos múltiples se usó la matriz de similaridad BLOSUM62 y el programa ClustalW (Thompson et al., 1994). Luego los alineamientos obtenidos fueron editados

mediante el Bioedit o Boxshade. Las secuencias nucleotídicas del gen *16S rRNA* de las cepas de *B. bacilliformis* fueron prácticamente idénticas entre ellas, pero mostraron, como se esperaba, varias diferencias al momento de ser alineadas con el gen *16S rRNA* de otras especies del género a pesar de tratarse de un gen altamente conservado.

<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.17	1	-----TGGCTAAGAGGGAAACGCGAGGCGGCGAGGCTTAACACATGCAAG	42
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	1	-----CCTGGCTCA---GGAACGTTGGCGGCGAGGCTTAACACATGCAAG	41
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.19	1	-----TCAGAACGAGCGCTGGCGGCGAGGCTTAACACATGCAAG	38
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.20	1	-----GATTCTGGCTCCCGAGCTGGCGGCGAGGCTTAACACATGCAAG	42
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.27	1	-----CGAACGCTGGCGGCGAGGCTTAACACATGCAAG	32
<i>B. bacilliformis</i> 35096	1	-----TGGTTCAGGACGAACGCTGGCGGCGAGGCTTAACACATGCAAG	42
<i>B. bacilliformis</i> ATCC 35685	1	TTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCGAGGCTTAACACATGCAAG	50
Clustal Consensus	1	*****	25
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.17	43	TCGAGCGCACTCTTTTGCAGTGAGCGGCAAAACGAGTGAGTAACGCGTGGG	92
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	42	TCGAGCGCACTCTTTTGCAGTGAGCGGCAAAACGAGTGAGTAACGCGTGGG	91
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.19	39	TCGAGCGCACTCTTTTGCAGTGAGCGGCAAAACGAGTGAGTAACGCGTGGG	88
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.20	43	TCGAGCGCACTCTTTTGCAGTGAGCGGCAAAACGAGTGAGTAACGCGTGGG	92
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.27	33	TCGAGCGCACTCTTTTGCAGTGAGCGGCAAAACGAGTGAGTAACGCGTGGG	82
<i>B. bacilliformis</i> 35096	43	TCGAGCGCACTCTTTTGCAGTGAGCGGCAAAACGAGTGAGTAACGCGTGGG	92
<i>B. bacilliformis</i> ATCC 35685	51	TCGAGCGCACTCTTTTGCAGTGAGCGGCAAAACGAGTGAGTAACGCGTGGG	100
Clustal Consensus	26	*****	75
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.17	93	AATCTACCCATCTCTACGGAATAACACAGACAAATTTGTGCTAATACAGT	142
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	92	AATCTACCCATCTCTACGGAATAACACAGACAAATTTGTGCTAATACAGT	141
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.19	89	AATCTACCCATCTCTACGGAATAACACAGACAAATTTGTGCTAATACAGT	138
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.20	93	AATCTACCCATCTCTACGGAATAACACAGACAAATTTGTGCTAATACAGT	142
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.27	83	AATCTACCCATCTCTACGGAATAACACAGACAAATTTGTGCTAATACAGT	132
<i>B. bacilliformis</i> 35096	93	AATCTACCCATCTCTACGGAATAACACAGACAAATTTGTGCTAATACAGT	142
<i>B. bacilliformis</i> ATCC 35685	101	AATCTACCCATCTCTACGGAATAACACAGACAAATTTGTGCTAATACAGT	150
Clustal Consensus	76	*****	124
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.17	143	ATACGTCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGAGATGGATGAGCCCGCGTTGG	192
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	142	ATACGTCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGAGATGGATGAGCCCGCGTTGG	191
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.19	139	ATACGTCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGAGATGGATGAGCCCGCGTTGG	188
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.20	143	ATACGTCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGAGATGGATGAGCCCGCGTTGG	192
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.27	133	ATACGTCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGAGATGGATGAGCCCGCGTTGG	182
<i>B. bacilliformis</i> 35096	143	ATACGTCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGAGATGGATGAGCCCGCGTTGG	192
<i>B. bacilliformis</i> ATCC 35685	151	ATACGTCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGAGATGGATGAGCCCGCGTTGG	200
Clustal Consensus	125	*****	172
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.17	193	ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCCCAACAGGCGACGATCCATAGCTG	241
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	192	ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCCCAACAGGCGACGATCCATAGCTG	241
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.19	189	ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCCCAACAGGCGACGATCCATAGCTG	238
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.20	193	ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCCCAACAGGCGACGATCCATAGCTG	242
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.27	183	ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCCCAACAGGCGACGATCCATAGCTG	232
<i>B. bacilliformis</i> 35096	193	ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCCCAACAGGCGACGATCCATAGCTG	242
<i>B. bacilliformis</i> ATCC 35685	201	ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCCCAACAGGCGACGATCCATAGCTG	250
Clustal Consensus	173	*****	221
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.17	242	GTCTGAGAGGATGATC-GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAAGACTCC	290
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	242	GTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAAGACTCC	291
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.19	239	GTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAAGACTCC	288
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.20	243	GTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAAGACTCC	292
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.27	233	GTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAAGACTCC	282
<i>B. bacilliformis</i> 35096	243	GTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAAGACTCC	292
<i>B. bacilliformis</i> ATCC 35685	251	GTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAAGACTCC	300
Clustal Consensus	222	*****	269

*B. bacilliformis* CIP 57.17 291 TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCCTGATCC 340  
*B. bacilliformis* CIP 57.18 292 TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCCTGATCC 341  
*B. bacilliformis* CIP 57.19 289 TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCCTGATCC 338  
*B. bacilliformis* CIP 57.20 293 TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCCTGATCC 342  
*B. bacilliformis* CIP 57.27 283 TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCCTGATCC 332  
*B. bacilliformis* 35096 293 TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCCTGATCC 342  
*B. bacilliformis* ATCC 35685 301 TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCCTGATCC 350  
Clustal Consensus 270 \*\*\*\*\* 319  
  
*B. bacilliformis* CIP 57.17 341 AGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTCAC 390  
*B. bacilliformis* CIP 57.18 342 AGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTCAC 391  
*B. bacilliformis* CIP 57.19 339 AGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTCAC 388  
*B. bacilliformis* CIP 57.20 343 AGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTCAC 392  
*B. bacilliformis* CIP 57.27 333 AGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTCAC 382  
*B. bacilliformis* 35096 343 AGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTCAC 392  
*B. bacilliformis* ATCC 35685 351 AGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTCAC 400  
Clustal Consensus 320 \*\*\*\*\* 369  
  
*B. bacilliformis* CIP 57.17 391 CGGTGAAGATAATGACGGTAGCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTG 440  
*B. bacilliformis* CIP 57.18 392 CGGTGAAGATAATGACGGTAGCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTG 441  
*B. bacilliformis* CIP 57.19 389 CGGTGAAGATAATGACGGTAGCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTG 438  
*B. bacilliformis* CIP 57.20 393 CGGTGAAGATAATGACGGTAGCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTG 442  
*B. bacilliformis* CIP 57.27 383 CGGTGAAGATAATGACGGTAGCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTG 432  
*B. bacilliformis* 35096 393 CGGTGAAGATAATGACGGTAGCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTG 442  
*B. bacilliformis* ATCC 35685 401 CGGTGAAGATAATGACGGTAGCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTG 450  
Clustal Consensus 370 \*\*\*\*\* 419  
  
*B. bacilliformis* CIP 57.17 441 CCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGATTTACTGG 490  
*B. bacilliformis* CIP 57.18 442 CCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGATTTACTGG 491  
*B. bacilliformis* CIP 57.19 439 CCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGATTTACTGG 488  
*B. bacilliformis* CIP 57.20 443 CCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGATTTACTGG 492  
*B. bacilliformis* CIP 57.27 433 CCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGATTTACTGG 482  
*B. bacilliformis* 35096 443 CCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGATTTACTGG 492  
*B. bacilliformis* ATCC 35685 451 CCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGATTTACTGG 500  
Clustal Consensus 420 \*\*\*\*\* 467  
  
*B. bacilliformis* CIP 57.17 491 GCGTAAAGCGCATGTAGGCGGATATTTAAGTCAGAGGTGAAATCCCAGGG 540  
*B. bacilliformis* CIP 57.18 492 GCGTAAAGCGCATGTAGGCGGATATTTAAGTCAGAGGTGAAATCCCAGGG 541  
*B. bacilliformis* CIP 57.19 489 GCGTAAAGCGCATGTAGGCGGATATTTAAGTCAGAGGTGAAATCCCAGGG 538  
*B. bacilliformis* CIP 57.20 493 GCGTAAAGCGCATGTAGGCGGATATTTAAGTCAGAGGTGAAATCCCAGGG 542  
*B. bacilliformis* CIP 57.27 483 GCGTAAAGCGCATGTAGGCGGATATTTAAGTCAGAGGTGAAATCCCAGGG 532  
*B. bacilliformis* 35096 493 GCGTAAAGCGCATGTAGGCGGATATTTAAGTCAGAGGTGAAATCCCAGGG 542  
*B. bacilliformis* ATCC 35685 501 GCGTAAAGCGCATGTAGGCGGATATTTAAGTCAGAGGTGAAATCCCAGGG 550  
Clustal Consensus 468 \*\*\*\*\* 517  
  
*B. bacilliformis* CIP 57.17 541 CTCAACCTTTGGAAGTGCCTTTGATACTGGATGCTCGAGTATGGAAGAGG 589  
*B. bacilliformis* CIP 57.18 542 CTCAACCTTTGGAAGTGCCTTTGATACTGGATGACTCGAGTATGGAAGAGG 591  
*B. bacilliformis* CIP 57.19 539 CTCAACCTTTGGAAGTGCCTTTGATACTGGATGACTCGAGTATGGAAGAGG 588  
*B. bacilliformis* CIP 57.20 543 CTCAACCTTTGGAAGTGCCTTTGATACTGGATGCTCGAGTATGGAAGAGG 592  
*B. bacilliformis* CIP 57.27 533 CTCAACCTTTGGAAGTGCCTTTGATACTGGATGCTCGAGTATGGAAGAGG 582  
*B. bacilliformis* 35096 543 CTCAACCTTTGGAAGTGCCTTTGATACTGGATGCTCGAGTATGGAAGAGG 592  
*B. bacilliformis* ATCC 35685 551 CTCAACCTTTGGAAGTGCCTTTGATACTGGATGCTCGAGTATGGAAGAGG 600  
Clustal Consensus 518 \*\*\*\*\* 566  
  
*B. bacilliformis* CIP 57.17 590 TGAGTGGAATTCCGAGTGATAGAGCTAAAATTCGTAGATATTTCGGAGGAAC 639  
*B. bacilliformis* CIP 57.18 592 TGAGTGGAATTCCGAGTGATAGAGCTAAAATTCGTAGATATTTCGGAGGAAC 641  
*B. bacilliformis* CIP 57.19 589 TGAGTGGAATTCCGAGTGATAGAGTAAAATTCGTAGATATTTCGGAGGAAC 638  
*B. bacilliformis* CIP 57.20 593 TGAGTGGAATTCCGAGTGATAGAGTAAAATTCGTAGATATTTCGGAGGAAC 642  
*B. bacilliformis* CIP 57.27 583 TGAGTGGAATTCCGAGTGATAGAGTAAAATTCGTAGATATTTCGGAGGAAC 632  
*B. bacilliformis* 35096 593 AGAGTGGAATTCCGAGTGATAGAGTAAAATTCGTAGATATTTCGGAGGAAC 642  
*B. bacilliformis* ATCC 35685 601 TGAGTGGAATTCCGAGTGATAGAGTAAAATTCGTAGATATTTCGGAGGAAC 650  
Clustal Consensus 566 \*\*\*\*\* 614  
  
*B. bacilliformis* CIP 57.17 640 ACCAG-GGCGAAGG-GGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAA 687  
*B. bacilliformis* CIP 57.18 642 ACCAGCGGCGAAGG-GGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAA 690  
*B. bacilliformis* CIP 57.19 639 ACCAGGGCGAAGGG-GGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAA 687  
*B. bacilliformis* CIP 57.20 643 ACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAA 692  
*B. bacilliformis* CIP 57.27 633 ACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAA 682  
*B. bacilliformis* 35096 643 ACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAA 692  
*B. bacilliformis* ATCC 35685 651 ACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAA 700  
Clustal Consensus 615 \*\*\*\*\* 657

*B. bacilliformis* CIP 57.17 688 AGCGTGGGGAGCAAAACAGGAT-AGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC 736  
*B. bacilliformis* CIP 57.18 691 AGCGTGGGGAGCAAAACAGGAT-AGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC 739  
*B. bacilliformis* CIP 57.19 688 AGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC 737  
*B. bacilliformis* CIP 57.20 693 AGCGTGGGGAGCTAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC 742  
*B. bacilliformis* CIP 57.27 683 AGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCCTAAAC 732  
*B. bacilliformis* 35096 693 AGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC 742  
*B. bacilliformis* ATCC 35685 701 AGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC 750  
Clustal Consensus 658 \*\*\*\*\* 704

*B. bacilliformis* CIP 57.17 737 TATGAATGTTAACCGTCGGGCAGTT-CTGCTCGGTGGCGACGTAACGC 785  
*B. bacilliformis* CIP 57.18 740 TATGAATGTTAGCCGTCGGGCAGTTTACTGCTCGGTGGCGACGTAACGC 789  
*B. bacilliformis* CIP 57.19 738 CATGAATGTTAACCGTCGGGCAGTT-CTGCTCGGTGGCGACGTAACGC 786  
*B. bacilliformis* CIP 57.20 743 TATGAATGTTGCGGTCGGGCAGTTTACTGCTCGGTGGCGACGTAACGC 792  
*B. bacilliformis* CIP 57.27 733 GATGAATGTTAGCCGTCGGGCAGTTTACTGCTCGGTGGCGACGTAACGC 782  
*B. bacilliformis* 35096 743 GATGAATGTTAGCCGTCGGGCAGTTTACTGCTCGGTGGCGACGTAACGC 792  
*B. bacilliformis* ATCC 35685 751 GATGAATGTTAGCCGTCGGGCAGTTTACTGCTCGGTGGCGACGTAACGC 800  
Clustal Consensus 704 \*\*\*\*\* 749

*B. bacilliformis* CIP 57.17 786 GTTAAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAACTCAAAGGA 835  
*B. bacilliformis* CIP 57.18 790 GTTAAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAACTCAAAGGA 839  
*B. bacilliformis* CIP 57.19 787 GTTAAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAACTCAAAGGA 836  
*B. bacilliformis* CIP 57.20 793 GTTAAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAACTCAAAGGA 842  
*B. bacilliformis* CIP 57.27 783 GTTAAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAACTCAAAGGA 832  
*B. bacilliformis* 35096 793 GTTACACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAACTCAAAGGA 842  
*B. bacilliformis* ATCC 35685 801 GTTAAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAACTCAAAGGA 850  
Clustal Consensus 750 \*\*\*\*\* 797

*B. bacilliformis* CIP 57.17 836 ATTGACGGGGGCCCGCAACGCGGTGGAGCATGTGGTTAAATTCGAAGCA 885  
*B. bacilliformis* CIP 57.18 840 ATTGACGGGGGCCCGCAACGCGGTGGAGCATGTGGTTAAATTCGAAGCA 889  
*B. bacilliformis* CIP 57.19 837 ATTGACGGGGGCCCGCAACGCGGTGGAGCATGTGGTTAAATTCGAAGCA 886  
*B. bacilliformis* CIP 57.20 843 ATTGACGGGGGCCCGCAACGCGGTGGAGCATGTGGTTAAATTCGAAGCA 892  
*B. bacilliformis* CIP 57.27 833 ATTGACGGGGGCCCGCAACGCGGTGGAGCATGTGGTTAAATTCGAAGCA 882  
*B. bacilliformis* 35096 843 ATTGACGGGGGCCCGCAACGCGGTGGAGCCTGTGGTTAAATTCGAAGCA 892  
*B. bacilliformis* ATCC 35685 851 ATTGACGGGGGCCCGCAACGCGGTGGAGCATGTGGTTAAATTCGAAGCA 900  
Clustal Consensus 798 \*\*\*\*\* 843

*B. bacilliformis* CIP 57.17 886 ACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCCGATCGCGGAGAGTGGAGA 935  
*B. bacilliformis* CIP 57.18 890 ACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCCGATCGCGGAGAGTGGAGA 939  
*B. bacilliformis* CIP 57.19 887 ACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCCGATCGCGGAGAGTGGAGA 936  
*B. bacilliformis* CIP 57.20 893 ACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCCGATCGCGGAGAGTGGAGA 942  
*B. bacilliformis* CIP 57.27 883 ACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCCGATCGCGGAGAGTGGAGA 932  
*B. bacilliformis* 35096 893 ACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCCGATCGCGGAGAGTGGAGA 942  
*B. bacilliformis* ATCC 35685 901 ACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCCGATCGCGGAGAGTGGAGA 950  
Clustal Consensus 844 \*\*\*\*\* 892

*B. bacilliformis* CIP 57.17 936 CACTTTCCTTCAGTTAGGCT-GATCGGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTG 984  
*B. bacilliformis* CIP 57.18 940 CACTTTCCTTCAGTTAGCTG-GATCGGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTG 988  
*B. bacilliformis* CIP 57.19 937 CACTTTCCTTCAGTTAGGCTGATCGGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTG 986  
*B. bacilliformis* CIP 57.20 943 CACTTTCCTTCAGTTAGGCTGGATCGGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTG 992  
*B. bacilliformis* CIP 57.27 933 CACTTTCCTTCAGTTAGGCTGGATCGGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTG 982  
*B. bacilliformis* 35096 943 CACTTTCCTTCAGTTAGGCTGGATCGGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTG 992  
*B. bacilliformis* ATCC 35685 951 CACTTTCCTTCAGTTAGGCTGGATCGGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTG 1000  
Clustal Consensus 893 \*\*\*\*\* 938

*B. bacilliformis* CIP 57.17 985 TCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC 1034  
*B. bacilliformis* CIP 57.18 989 TCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC 1038  
*B. bacilliformis* CIP 57.19 987 TCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC 1035  
*B. bacilliformis* CIP 57.20 993 TCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC 1042  
*B. bacilliformis* CIP 57.27 983 TCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC 1032  
*B. bacilliformis* 35096 993 TCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC 1042  
*B. bacilliformis* ATCC 35685 1001 TCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC 1050  
Clustal Consensus 939 \*\*\*\*\* 985

*B. bacilliformis* CIP 57.17 1035 TCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACCTCTAAGGGGACTGCCGGT 1084  
*B. bacilliformis* CIP 57.18 1039 TCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACCTCTAAGGGGACTGCCGGT 1088  
*B. bacilliformis* CIP 57.19 1036 TCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACCTCTAAGGGGACTGCCGGT 1085  
*B. bacilliformis* CIP 57.20 1043 TCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACCTCTAAGGGGACTGCCGGT 1092  
*B. bacilliformis* CIP 57.27 1033 TCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACCTCTAAGGGGACTGCCGGT 1082  
*B. bacilliformis* 35096 1043 TCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACCTCTAAGGGGACTGCCGGT 1092  
*B. bacilliformis* ATCC 35685 1051 TCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACCTCTAAGGGGACTGCCGGT 1100  
Clustal Consensus 986 \*\*\*\*\* 1035

<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.17	1085	GATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTAC	1134
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	1089	GATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTAC	1138
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.19	1086	GATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTAC	1134
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.20	1093	GATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTAC	1142
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.27	1083	GATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTAC	1132
<i>B. bacilliformis</i> 35096	1093	GATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTAC	1142
<i>B. bacilliformis</i> ATCC 35685	1101	GATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTAC	1150
Clustal Consensus	1036	*****	1084
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.17	1135	GGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAAAC	1184
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	1139	GGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAAAC	1188
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.19	1135	GGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAAAC	1184
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.20	1143	GGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAAAC	1192
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.27	1133	GGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAAAC	1182
<i>B. bacilliformis</i> 35096	1143	GGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAAAC	1192
<i>B. bacilliformis</i> ATCC 35685	1151	GGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAAAC	1200
Clustal Consensus	1085	*****	1134
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.17	1185	CGCAAGGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACCTCT	1234
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	1189	CGCAAGGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACCTCT	1238
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.19	1185	CGCAAGGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACCTCT	1234
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.20	1193	CGCAAGGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACCTCT	1242
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.27	1183	CGCAAGGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACCTCT	1232
<i>B. bacilliformis</i> 35096	1193	CGCAAGGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACCTCT	1242
<i>B. bacilliformis</i> ATCC 35685	1201	CGCAAGGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACCTCT	1250
Clustal Consensus	1135	*****	1184
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.17	1235	GCAACTCGAGTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATG	1284
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	1239	GCAACTCGAGTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATG	1288
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.19	1235	GCAACTCGAGTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATG	1284
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.20	1243	GCAACTCGAGTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATG	1292
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.27	1233	GCAACTCGAGTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATG	1282
<i>B. bacilliformis</i> 35096	1243	GCAACTCGAGTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATG	1292
<i>B. bacilliformis</i> ATCC 35685	1251	GCAACTCGAGTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATG	1300
Clustal Consensus	1185	*****	1234
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.17	1285	CCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACCCGCCCGTCACACCATG	1334
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	1289	CCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACCCGCCCGTCACCCCATG	1338
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.19	1285	CCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACCCGCCCGTCAC-CATG	1333
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.20	1293	CCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACCCGCCCGTCACACCATG	1342
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.27	1283	CCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACCCGCCCGTCACACCATG	1332
<i>B. bacilliformis</i> 35096	1293	CCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACCCGCCCGTCACACCATG	1342
<i>B. bacilliformis</i> ATCC 35685	1301	CCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACCCGCCCGTCACACCATG	1350
Clustal Consensus	1235	*****	1283
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.17	1335	GGAGTTGGTTTTACCCGAAGGTGCTGTGCTAACCGCAAGGAAGCAGGC	1384
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	1339	GGAGTTGGTTTTACCCGAAGGTGCTGTGCTAACCGCAAGGAAGCAGGC	1388
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.19	1334	GGAGTTGGTTTTACCCGAAGGTGCTGTGCTAACCGCAAGGAAGCAGGC	1383
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.20	1343	GGAGTTGGTTTTACCCGAAGGTGCTGTGCTAACCGCAAGGAAGCAGGC-	1390
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.27	1333	GGAGTTGGTTTTACCCGAAGGTGCTGTGCTA-CGCAAGGAAGCAGGC	1380
<i>B. bacilliformis</i> 35096	1343	GGAGTTGGTTTTACCCGAAGGTGCTGTGCTAACCGCAAGGAAGCAGGC	1392
<i>B. bacilliformis</i> ATCC 35685	1351	GGAGTTGGTTTTACCCGAAGGTGCTGTGCTAACCGCAAGGAAGCAGGC	1400
Clustal Consensus	1284	*****	1329
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.17	1385	CCACGGTAGG-----	1394
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	1389	CCACGGAAGG-----	1398
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.19	1384	CCACGGCAGG-----	1393
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.20	1390	-ACGGTAGG-----	1398
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.27	1381	CCACGG-----	1386
<i>B. bacilliformis</i> 35096	1393	CCACGGTAGG-----	1402
<i>B. bacilliformis</i> ATCC 35685	1401	CCACGGTAGGGTCAGCGACTGGGGTGAAGTCGTAAACAAGGATAGCCGTAGG	1450
Clustal Consensus	1329	****	1333

**Figura 14.-** Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen *16S rRNA* de las cepas *B. bacilliformis* del Instituto Pasteur (CIP 57.17, CIP 57.18, CIP 57.19, CIP 57.20 y CIP 57.27), cepa clínica *B. bacilliformis* 35096 y cepa *B. bacilliformis* ATCC 35685 del GenBank, usando CLUSTALW y Bioedit.

```

B. clarridgeiae CIP 104772      1  ----- 1
B. clarridgeiae M9HN-SHQ      1  -----CACATGCAAG 10
B. vinsonii CIP 103738        1  -----G 1
B. vinsonii ATCC VR-152       1  -----CTCAGAACGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAG 39
B. bacilliformis ATCC 35685   1  TTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAG 50
Clustal Consensus              1  ----- 1

B. clarridgeiae CIP 104772      1  -----TAGTCATCTAGAGTGAGCGGCAGACAGGTGAGTAACG-CGTGG 42
B. clarridgeiae M9HN-SHQ      11 TCGAGCGCCTCATTTAGAGTGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACG-CGTGG 59
B. vinsonii CIP 103738        2  TCGAGCGCAGTCTTTAAGAGTGAGCAG-AAACGGGAGAGTAAAGACGTGG 50
B. vinsonii ATCC VR-152       40 TCGAGCGCCTCTTTTAGAGTGAGCGGCAGGCGGTGAGTAACG-CGTGG 88
B. bacilliformis ATCC 35685   51 TCGAGCGCCTCTTTTGCAGTGAGCGGCAGGCGAGTGAGTAACG-CGTGG 99
Clustal Consensus              1  * * * * * 28

B. clarridgeiae CIP 104772      43 GATTCTACCCCTTTTCTACGGAATAGCACAGAGAAATTTGTGCTAATACCG 92
B. clarridgeiae M9HN-SHQ      60 GAATCTACCCCTTTTCTACGGAATAACACAGAGAAATTTGTGCTAATACCG 109
B. vinsonii CIP 103738        51 GAATCTACCCATCTCTACGGAATAACACAGAGAAATTTGTGCTAATACCG 100
B. vinsonii ATCC VR-152       89 GAATCTACCCATCTCTACGGAATAACACAGAGAAATTTGTGCTAATACCG 138
B. bacilliformis ATCC 35685   100 GAATCTACCCATCTCTACGGAATAACACAGCAAATTTGTGCTAATACAG 149
Clustal Consensus              29 * * * * * 72

B. clarridgeiae CIP 104772      93 TATACGTCCTACTGGAGAAAGATCTATCGGACAAGGAAGAGCCCGCGGTG 142
B. clarridgeiae M9HN-SHQ      110 TATACGTCCTACTGGAGAAAGATTTATCGGAGAAGGATGAGCCCGCGTTG 159
B. vinsonii CIP 103738        101 TATACGTCCTTAGGGAGAAAGATTTATCGGAGATGGATGAGCCCGCGTTG 150
B. vinsonii ATCC VR-152       139 TATACGTCCTTAGGGAGAAAGATTTATCGGAGATGGATGAGCCCGCGTTG 188
B. bacilliformis ATCC 35685   150 TATACGTCCTTCGGAGAAAGATTTATCGGAGATGGATGAGCCCGCGTTG 199
Clustal Consensus              73 * * * * * 114

B. clarridgeiae CIP 104772      143 GATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCCAGGCGACGATCCATAGCT 192
B. clarridgeiae M9HN-SHQ      160 GATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCCATAGCT 209
B. vinsonii CIP 103738        151 GATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCCATAGCT 200
B. vinsonii ATCC VR-152       189 GATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCCATAGCT 238
B. bacilliformis ATCC 35685   200 GATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCCCAAGGCGACGATCCATAGCT 249
Clustal Consensus              115 * * * * * 160

B. clarridgeiae CIP 104772      193 GGTGTGAGAGGATGGCCAGCCGCACTGGGACTGAGACA-GGATCAAATC 241
B. clarridgeiae M9HN-SHQ      210 GGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGCCCCAGACTC 259
B. vinsonii CIP 103738        201 GGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGATCAGACTC 250
B. vinsonii ATCC VR-152       239 GGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGCCCCAGACTC 288
B. bacilliformis ATCC 35685   250 GGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGCCCCAGACTC 299
Clustal Consensus              161 * * * * * 202

B. clarridgeiae CIP 104772      241 --TACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCGTGAT 289
B. clarridgeiae M9HN-SHQ      259 -CTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCGTGAT 308
B. vinsonii CIP 103738        251 TCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCGTGAT 300
B. vinsonii ATCC VR-152       288 -CTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCGTGAT 337
B. bacilliformis ATCC 35685   299 -CTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCGTGAT 348
Clustal Consensus              202 * * * * * 250

B. clarridgeiae CIP 104772      290 CCAGCCATGCCCGTGAGTGATGAAGGCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTC 339
B. clarridgeiae M9HN-SHQ      309 CCAGCCATGCCCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTC 358
B. vinsonii CIP 103738        301 CCAGCCATGCCCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTC 350
B. vinsonii ATCC VR-152       338 CCAGCCATGCCCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTC 387
B. bacilliformis ATCC 35685   349 CCAGCCATGCCCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTC 398
Clustal Consensus              251 * * * * * 297

B. clarridgeiae CIP 104772      340 ACCGGTGAAGATAACGACGGCAACCCGAGAGAAGCCCCGGCTAACTTCG 389
B. clarridgeiae M9HN-SHQ      359 ACCGGTGAAGATAATGACGGTAACCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCG 408
B. vinsonii CIP 103738        351 ACCGGTGAAGATAATGACGGTAACCGGAGATTTAGCCCCGGCTAACTTCG 400
B. vinsonii ATCC VR-152       388 ACCGGTGAAGATAATGACGGTAACCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCG 437
B. bacilliformis ATCC 35685   399 ACCGGTGAAGATAATGACGGTAGCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCG 448
Clustal Consensus              298 * * * * * 340

B. clarridgeiae CIP 104772      390 TGCCAGCAGCCCGGTAAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGATTACT 439
B. clarridgeiae M9HN-SHQ      409 TGCCAGCAGCCCGGTAAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGATTACT 458
B. vinsonii CIP 103738        401 TGCCAGCAGCCCGGTAAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGATTACT 450
B. vinsonii ATCC VR-152       438 TGCCAGCAGCCCGGTAAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGATTACT 487
B. bacilliformis ATCC 35685   449 TGCCAGCAGCCCGGTAAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGATTACT 498
Clustal Consensus              341 * * * * * 390

```

<i>B. clarridgeiae</i> CIP 104772	440	GGGCGTAAAGCGCATGTAGGCGGATATTTAAGTCAGAGGTGAAATCCCAG	489
<i>B. clarridgeiae</i> M9HN-SHQ	459	GGGCGTAAAGCGCATGTAGGCGGATATTTAAGTCAGAGGTGAAATCCCAG	508
<i>B. vinsonii</i> CIP 103738	451	GGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATATTTAAGTCAGAGGTGAAATCCCAG	500
<i>B. vinsonii</i> ATCC VR-152	488	GGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATATTTAAGTCAGAGGTGAAATCCCAG	537
<i>B. bacilliformis</i> ATCC 35685	499	GGGCGTAAAGCGCATGTAGGCGGATATTTAAGTCAGAGGTGAAATCCCAG	548
Clustal Consensus	391	*****	439
<i>B. clarridgeiae</i> CIP 104772	490	GGCTCAACCCGTGGAACGTCCTTTGA--CTGGATATCTTGAGTGTGGAAGA	537
<i>B. clarridgeiae</i> M9HN-SHQ	509	GGCTCAACCCGTGGAACGTCCTTTGATACTGGATATCTTGAGTGTGGAAGA	558
<i>B. vinsonii</i> CIP 103738	501	GGCTCAACCCGTGGAACGTCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGA	550
<i>B. vinsonii</i> ATCC VR-152	538	GGCTCAACCCGTGGAACGTCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGA	587
<i>B. bacilliformis</i> ATCC 35685	549	GGCTCAACCTTGGAACGTCCTTTGATACTGGATGTCTCGAGTATGGAAGA	598
Clustal Consensus	440	*****	482
<i>B. clarridgeiae</i> CIP 104772	538	GGTGAGTGGAAATTCGAGTGTAGAGCTACCATTCTAGATATTCGGAGGA	587
<i>B. clarridgeiae</i> M9HN-SHQ	559	GGTGAGTGGAAATTCGAGTGTAGAGGTAAAATTCGTAGATATTCGGAGGA	608
<i>B. vinsonii</i> CIP 103738	551	GGTGAGTGGAAATTCGAGTGTAGAGGTAAAGTTCGTAGATATTCGGAGGA	600
<i>B. vinsonii</i> ATCC VR-152	588	GGTGAGTGGAAATTCGAGTGTAGAGGTAAAATTCGTAGATATTCGGAGGA	637
<i>B. bacilliformis</i> ATCC 35685	599	GGTGAGTGGAAATTCGAGTGTAGAGGTAAAATTCGTAGATATTCGGAGGA	648
Clustal Consensus	483	*****	528
<i>B. clarridgeiae</i> CIP 104772	588	ACACCCAGTGGCGAAAGCGGCTCACTGGTCCAT-ACTGACGCTGAGGTGC	636
<i>B. clarridgeiae</i> M9HN-SHQ	609	ACACCCAGTGGCGAA- GGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGC	657
<i>B. vinsonii</i> CIP 103738	601	ACACCCAGTGGCGAA- GGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACCTGAGGTGC	649
<i>B. vinsonii</i> ATCC VR-152	638	ACACCCAGTGGCGAA- GGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGC	686
<i>B. bacilliformis</i> ATCC 35685	649	ACACCCAGTGGCGAA- GGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGC	697
Clustal Consensus	529	*****	574
<i>B. clarridgeiae</i> CIP 104772	637	GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCAGTA	686
<i>B. clarridgeiae</i> M9HN-SHQ	658	GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTA	707
<i>B. vinsonii</i> CIP 103738	650	GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC- GGTAGTCCACGCCGTA	697
<i>B. vinsonii</i> ATCC VR-152	687	GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTA	736
<i>B. bacilliformis</i> ATCC 35685	698	GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTA	747
Clustal Consensus	575	*****	621
<i>B. clarridgeiae</i> CIP 104772	687	AACGATG---GTTAGCCGTTGGGTGGTTTACTGCTCAGTCGCGCAGCTAA	733
<i>B. clarridgeiae</i> M9HN-SHQ	708	AACGATGAATGTTAGCCGTTGGGTGGTTTACTGCTCAGTGGCGCAGCTAA	757
<i>B. vinsonii</i> CIP 103738	698	AACGATGAATGTTAGCCGTCGGGCGGTTTACTGCTCGGTGGCGCAGCTAA	747
<i>B. vinsonii</i> ATCC VR-152	737	AACGATGAATGTTAGCCGTCGGGCGGTTTACTGCTCGGTGGCGCAGCTAA	786
<i>B. bacilliformis</i> ATCC 35685	748	AACGATGAATGTTAGCCGTCGGGCGAGTTTACTGCTCGGTGGCGCAGCTAA	797
Clustal Consensus	622	*****	661
<i>B. clarridgeiae</i> CIP 104772	734	CGCATTAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGTAAGATTAAAACTCAAA	783
<i>B. clarridgeiae</i> M9HN-SHQ	758	CGCATTAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAA	807
<i>B. vinsonii</i> CIP 103738	748	CGCATTAACATTAAAGCCTGGGGTGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAA	797
<i>B. vinsonii</i> ATCC VR-152	787	CGCATTAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAA	836
<i>B. bacilliformis</i> ATCC 35685	798	CGCGTTAAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAA	847
Clustal Consensus	662	***	706
<i>B. clarridgeiae</i> CIP 104772	784	GGA--TGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCCTTT	831
<i>B. clarridgeiae</i> M9HN-SHQ	808	GGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA-	856
<i>B. vinsonii</i> CIP 103738	798	GGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCG-TG-AGCATGTGGTTTAATTCGA-	844
<i>B. vinsonii</i> ATCC VR-152	837	GGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCG-TGGAGCATGTGGTTTAATTCGA-	884
<i>B. bacilliformis</i> ATCC 35685	848	GGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA-	896
Clustal Consensus	707	***	749
<i>B. clarridgeiae</i> CIP 104772	832	AGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCCGATCGCGGAA-GTG	880
<i>B. clarridgeiae</i> M9HN-SHQ	857	AGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCCGATCGCGGGAAGTG	906
<i>B. vinsonii</i> CIP 103738	845	AGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCCGATCGCGGAAGGTG	894
<i>B. vinsonii</i> ATCC VR-152	885	AGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCCGATCGCGGAAGGTG	934
<i>B. bacilliformis</i> ATCC 35685	897	AGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCCGATCGCGGAGAGTG	946
Clustal Consensus	750	*****	796
<i>B. clarridgeiae</i> CIP 104772	881	GAGACACCTCCCTTCAGTC-GGCTGGATCGGAGACAGGTGCTGCATGGCT	929
<i>B. clarridgeiae</i> M9HN-SHQ	907	GAGACACCTCCCTTCAGTTGGCTGGATCGGAGACAGGTGCTGCATGGCT	956
<i>B. vinsonii</i> CIP 103738	895	GAGACACCTCCCTTCAGTTAGGCTGGATCGGAGACAGGTGCTGCATGGCT	944
<i>B. vinsonii</i> ATCC VR-152	935	GAGACACCTCCCTTCAGTTAGGCTGGATCGGAGACAGGTGCTGCATGGCT	984
<i>B. bacilliformis</i> ATCC 35685	947	GAGACACTTCCTTCAGTTAGGCTGGATCGGAGACAGGTGCTGCATGGCT	996
Clustal Consensus	797	*****	841



```

B. clarridgeiae CIP 104772      930  GTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA 979
B. clarridgeiae M9HN-SHQ      957  GTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA 1006
B. vinsonii CIP 103738        945  GTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAGCGAGCGCA 994
B. vinsonii ATCC VR-152       985  GTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA 1034
B. bacilliformis ATCC 35685   997  GTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA 1046
Clustal Consensus               842  ***** 890

B. clarridgeiae CIP 104772      980  ACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACCTCTAGGGGGACTGC 1029
B. clarridgeiae M9HN-SHQ      1007  ACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACCTCTAGGGGGACTGC 1056
B. vinsonii CIP 103738        995  ACGCTCGCCCTTAGTTGAAAGCATTAGTTG--CACTCTAAGGGGACTGC 1042
B. vinsonii ATCC VR-152       1035  ACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACCTCTAAGGGGGACTGC 1084
B. bacilliformis ATCC 35685   1047  ACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACCTCTAAGGGGGACTGC 1096
Clustal Consensus               891  ** ***** 934

B. clarridgeiae CIP 104772      1030  CGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATG---- 1075
B. clarridgeiae M9HN-SHQ      1057  CGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCC 1106
B. vinsonii CIP 103738        1043  CGGTGATAAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCC 1092
B. vinsonii ATCC VR-152       1085  CGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCC 1134
B. bacilliformis ATCC 35685   1097  CGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCC 1146
Clustal Consensus               935  ***** 979

B. clarridgeiae CIP 104772      1075  ----- 1075
B. clarridgeiae M9HN-SHQ      1107  TTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCG 1156
B. vinsonii CIP 103738        1093  GGGCGGGCTGGCCCTACACACGTGCTTCAATGGCGGTG--CAGTGGGCAGCG 1141
B. vinsonii ATCC VR-152       1135  TTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCG 1184
B. bacilliformis ATCC 35685   1147  TTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCG 1196
Clustal Consensus               979  979

B. clarridgeiae CIP 104772      1075  ----- 1075
B. clarridgeiae M9HN-SHQ      1157  AGATCGCAAGGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCA 1206
B. vinsonii CIP 103738        1142  AGACCGCGAGGTCGAGGTAATCTCCATAAGCCATCTCCGTCGGATTGCA 1191
B. vinsonii ATCC VR-152       1185  AGACCGCGAGGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCA 1234
B. bacilliformis ATCC 35685   1197  AAACCGCAAGGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCA 1246
Clustal Consensus               979  979

B. clarridgeiae CIP 104772      1075  ----- 1075
B. clarridgeiae M9HN-SHQ      1207  CTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAG 1256
B. vinsonii CIP 103738        1192  CTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAG 1241
B. vinsonii ATCC VR-152       1235  CTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAG 1284
B. bacilliformis ATCC 35685   1247  CTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAG 1296
Clustal Consensus               979  979

B. clarridgeiae CIP 104772      1075  ----- 1075
B. clarridgeiae M9HN-SHQ      1257  CATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACAC 1306
B. vinsonii CIP 103738        1242  CATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACC----- 1280
B. vinsonii ATCC VR-152       1285  CATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACAC 1334
B. bacilliformis ATCC 35685   1297  CATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACAC 1346
Clustal Consensus               979  979

```

**Figura 15.-** Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas del gen *16S rRNA* de las cepas del Instituto Pasteur, *B. vinsonii* subsp. *vinsonii* CIP 103738, *B. clarridgeiae* CIP 104772, y las cepas *B. vinsonii* ATCC VR-152, *B. clarridgeiae* M9HN-SHQ y *B. bacilliformis* ATCC 35685 del GenBank, usando CLUSTALW y Bioedit.



#### 4.4. Amplificación por PCR de los genes *ialB* y *flaA*

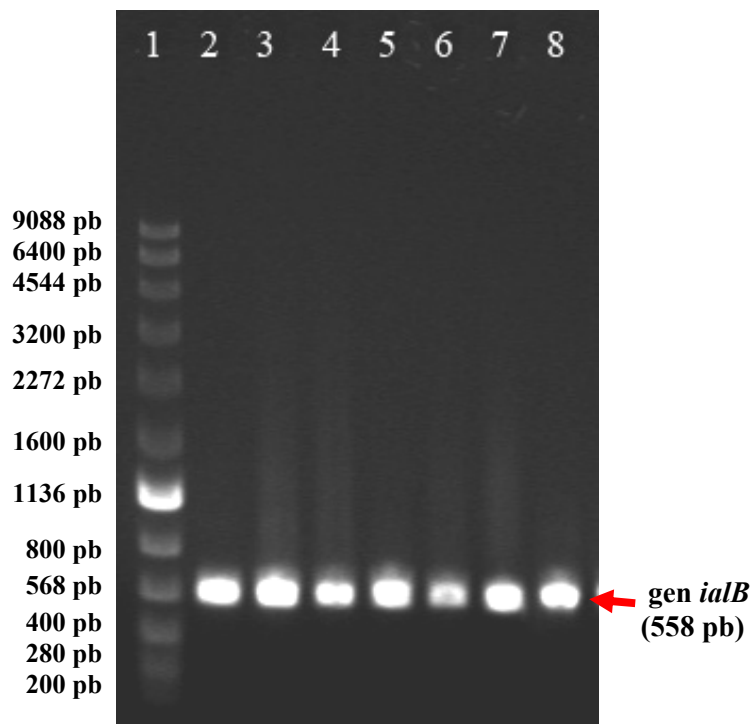
A partir de las muestras de DNA genómico obtenido de las 6 especies de *Bartonella* (*B. henselae*, *B. vinsonii* subsp. *vinsonii*, *B. elizabethae*, *B. clarridgeiae*, *B. bovis* y *B. bacilliformis*) se amplificó el gen *ialB*. Los oligonucleótidos diseñados y utilizados para esta PCR fueron los siguientes:

**F-*ialB*:** 5'-**cacc** atg aaa aaa ata tta aat tta ttt g-3', Tm= 59

**R-*ialB*:** 5'-ttt ttg caa aga agt taa acg ctt aag-3', Tm= 62

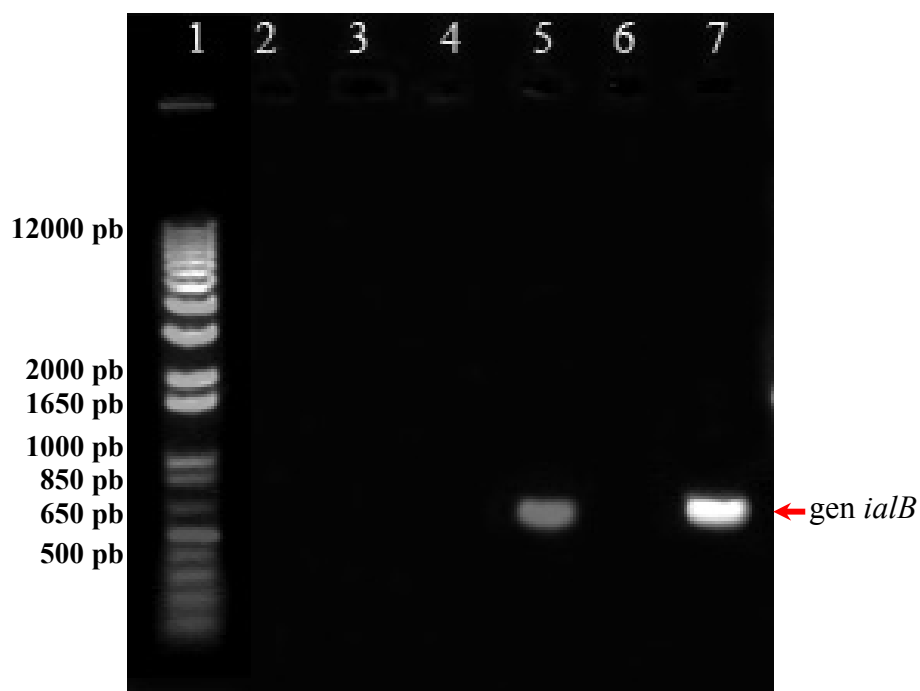
Los ensayos de PCR del gen *ialB* de las cepas de *B. bacilliformis* se hicieron preliminarmente utilizando la enzima AccuPrime<sup>TM</sup> Taq DNA polymerase High Fidelity, para evaluar que los oligonucleótidos diseñados sean los adecuados, es decir, que hibridizen (enganchen) de manera específica y establecer el programa óptimo de PCR. En el programa de PCR optimizado se utilizó 58°C como la temperatura de hibridación ideal.

Antes de utilizar los DNA genómicos de las otras 5 especies de *Bartonella* (*B. henselae*, *B. vinsonii* subsp. *vinsonii*, *B. elizabethae*, *B. clarridgeiae* y *B. bovis*) en un ensayo de PCR para amplificar el gen *ialB*, se estandarizó todo con las muestras de *B. bacilliformis*. Es así que teniendo en cuenta la temperatura media (Tm) de los oligonucleótidos utilizados se llegó a determinar que la temperatura de hibridación de 58°C fue la que permitió visualizar una sola banda específica. Todos los productos de PCR obtenidos de *B. bacilliformis*, fueron resueltos en un gel de agarosa al 1%, donde se observó un amplicón de aproximadamente 558 pb (Figura 16).



**Figura 16.-** Amplificación por PCR del gen *ialB* utilizando como molde DNA genómico de las cepas *B. bacilliformis* y la enzima AccuPrime™ Taq DNA Polymerase High Fidelity. Carriles: (1) marcador de peso molecular Leon™ que va en el rango de 200 a 9088 pb, (2) cepa CIP 77.27, (3) cepa CIP 57.17, (4) cepa CIP 57.18, (5) cepa CIP 57.19, (6) cepa 35096, (7) cepa CIP 57.20 y (8) cepa CIP 57.18. La flecha está a la altura de las bandas que corresponden a los amplificados del gen *ialB*.

El haber decidido hacer un ensayo de amplificación del gen *ialB* a partir del DNA genómico de las otras 5 especies de *Bartonella*, fue para evaluar si dicho gen no se encontraba en otra especie del género *Bartonella*, siendo por ende específico de la especie *B. bacilliformis*. Este ensayo se realizó bajo las mismas condiciones de amplificación empleadas con *B. bacilliformis*, es decir se usó el mismo programa de PCR con una temperatura de hibridación de 58°C y como control positivo se empleó DNA de *B. bacilliformis* CIP 57.18. Los productos obtenidos se observaron en un gel de agarosa al 1% (Figura 17).



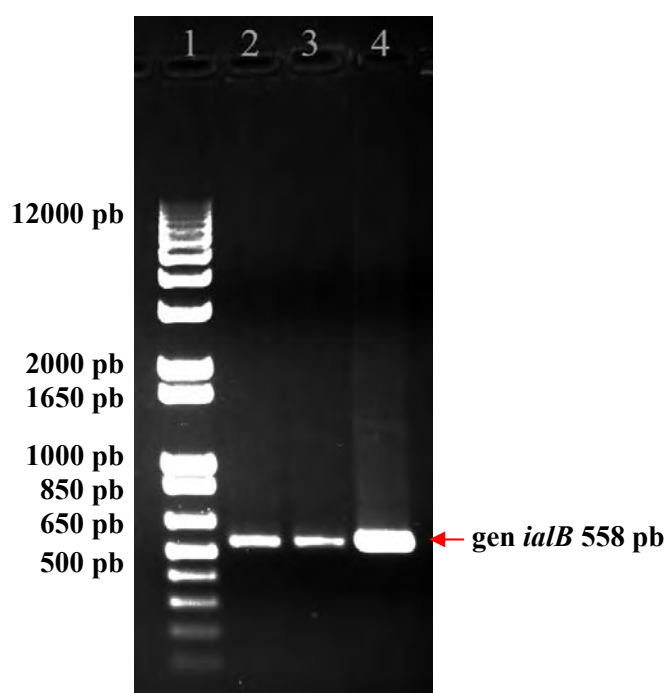
**Figura 17.-** Amplificación por PCR del gen *ialB* a partir de DNA genómico con la enzima *Taq* High Fidelity. Carriles: (1) marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), (2) *B. henselae* CIP 103737, (3) *B. vinsonii* subsp. *vinsonii* CIP 103738, (4) *B. elizabethae* CIP 103761, (5) *B. clarridgeiae* CIP 104772, (6) *B. bovis* CIP 106692 y (7) *B. bacilliformis* CIP 57.18. La flecha está a la altura de las bandas que corresponden a los amplificados del gen *ialB*.

Contrariamente, a lo que se esperaba obtener de acuerdo a la literatura revisada (Ventura y Padilla, 2003), es decir, evidenciar la banda del amplicón solo para *B. bacilliformis*, el gel (Figura 17) demuestra que en el carril donde se cargó el producto de PCR obtenido a partir de *B. clarridgeiae* CIP 104772, hay la presencia de un amplicón de aproximadamente 558 pb producido con los oligonucleótidos del gen *ialB* de *B. bacilliformis*, tal como se observa también en el control positivo. Este amplicón además fue obtenido en una PCR de colonia. Posteriormente, este amplicón fue secuenciado y alineado con la base de datos disponibles para este gen en el NCBI, confirmándose que se trataba del gen *ialB* de *B. bacilliformis* (ver apartado 4.9). Esto descarta la utilidad del gen *ialB* como marcador único y específico de *B. bacilliformis*.

Luego de haber definido y estandarizado las condiciones de amplificación que se usaría para el gen *ialB* de *B. bacilliformis*, se hicieron las PCR definitivas que servirían para la clonación del gen *ialB* usando los amplicones obtenidos. Estos

ensayos se realizaron tomando como muestras representativas de la especie a los DNA genómicos de las cepas *B. bacilliformis* CIP 77.27, *B. bacilliformis* CIP 57.17 y *B. bacilliformis* CIP 57.18, pero usando la enzima AccuPrime™ Pfx DNA polymerase, con una temperatura de hibridación de 58°C, la cual nos permitió obtener fragmentos de PCR con extremos truncos que era lo que se necesitaba para el ensayo con el vector de clonamiento y expresión pET101/D-TOPO®, (Invitrogen, 2006). Además esta polimerasa hace una lectura de prueba (“proofreading”), por poseer actividad exonucleasa 3’-5’.

Los productos PCR obtenidos fueron resueltos en un gel de agarosa al 1% donde se observó la banda de 558 pb que correspondía al gen *ialB*. Luego todos los amplicones fueron purificados del resto de oligonucleótidos y DNA molde con el kit comercial Purelink™ PCR Purification y nuevamente se les corrió en un gel de agarosa al 1% (Figura 18). La purificación se realizó con la finalidad de evitar interferencias al momento de ensayar la clonación en el vector pET101/D-TOPO®, (Invitrogen, 2006).



**Figura 18.-** Productos de PCR del gen *ialB* de *B. bacilliformis* obtenidos con la enzima AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase, que fueron purificados con el kit comercial PureLinK™ PCR Purification (Invitrogen). Carriles: (1) marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), (2) *B. bacilliformis* CIP 77.27, (3) *B. bacilliformis* CIP 57.17 y (4) *B. bacilliformis* CIP 57.18. La flecha está a la altura de los amplificados del gen *ialB*.

Observando las extracciones de DNA genómico obtenidas con las cepas de *B. bacilliformis*, es que se eligió a *B. bacilliformis* CIP 77.27, *B. bacilliformis* CIP 57.17 y *B. bacilliformis* CIP 57.18, como muestras representativas de esta especie para realizar los demás experimentos, en base a que estaban en mejores condiciones de pureza e integridad en comparación a las otras muestras de DNA de *B. bacilliformis*, según se visualizó en los geles (Figura 8 y 9). Como el amplicón del gen *ialB* obtenido con la cepa CIP 57.18 fue el que mejor integridad presentaba en la electroforesis (Figura 18), se escogió el DNA de esta cepa como molde para las PCR con el gen *flaA*.

Los oligonucleótidos diseñados y utilizados para la PCR del gen *flaA* fueron:

**F-*flaA*:** 5'-**cacc** atg ggt tct agt ata tta ac-3', T<sub>m</sub>= 54

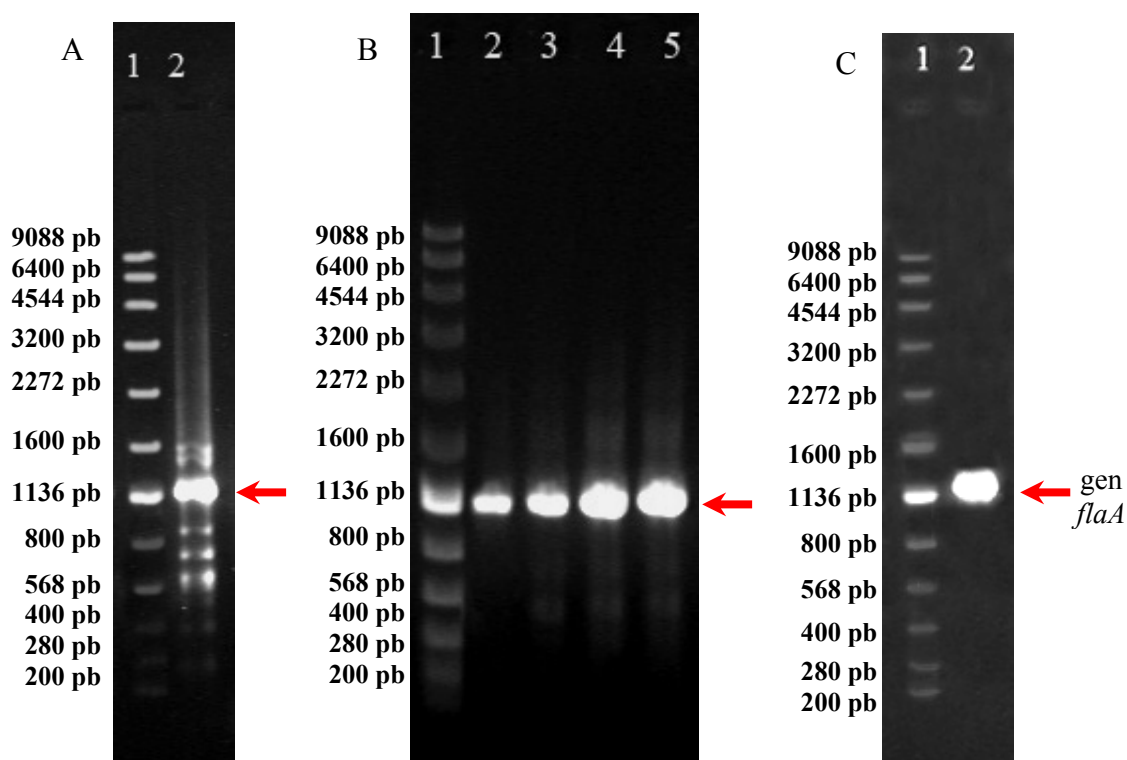
**R-*flaA*:** 5'-aaa tat tct ggc tgc cct g-3', T<sub>m</sub>= 58

Los oligonucleótidos F-*flaA* al igual que el F-*ialB* tenían añadido en el 5' una cola cacc, porque era indispensable para la clonación del producto de PCR (ver apartado 3.7.3).

La amplificación del gen *flaA* con la enzima AccuPrime<sup>TM</sup> Taq DNA polymerase High Fidelity, se trabajó con el mismo programa de PCR utilizado para amplificar el gen *ialB*, excepto en la temperatura de hibridación, ya que en base a la T<sub>m</sub> de los oligonucleótidos empleados se usó inicialmente 55°C, la que luego fue cambiada porque observando el gel de agarosa donde se corrió el producto PCR, se halló una banda de 1128 pb que corresponderían al gen *flaA*, así como muchas bandas inespecíficas (Figura 19A).

Finalmente, el programa de PCR para obtener el amplicón de *flaA* para ser clonado se realizó con 58°C como temperatura de hibridación, sin embargo el problema de las bandas inespecíficas seguía, por lo que se cambió la temperatura a 60°C y se usó ambas DNA polimerasas para dos reacciones independientes de 100 µL, es decir la enzima AccuPrime<sup>TM</sup> Taq DNA Polymerase High Fidelity (que genera productos PCR con extremos cohesivos por añadir una deoxiadenosina (A) en el extremo 3' del producto PCR) y la enzima AccuPrime<sup>TM</sup> Pfx DNA Polymerase (que genera productos PCR con extremos truncos).

Todos los productos de PCR obtenidos, fueron resueltos en un gel de agarosa al 1%, donde se observó nuestra banda de interés como un amplicón de aproximadamente 1128 pb, pero también algunas otras bandas muy tenues e inespecíficas (Figura 19B). Por este motivo, todo el producto de PCR del gen *flaA* obtenido con la enzima AccuPrime™ *Pfx* DNA Polymerase, que era el amplicón que se necesitaba para insertar en el vector de clonamiento y expresión pET101/D-TOPO®, (Invitrogen, 2006), fue resuelto nuevamente en una agarosa de bajo punto de fusión al 1% y posteriormente escindido de dicho gel para su respectiva purificación con el kit comercial QIAquick Gel Extraction. El producto purificado se corrió en un gel de agarosa al 1%, observando recién sólo la banda de 1128 pb correspondiente al gen *flaA* (Figura 19C).



**Figura 19.-** Amplificación por PCR del gen *flaA* a partir de DNA genómico de *B. bacilliformis* CIP 57.18. **(A)** PCR con la enzima AccuPrime™ Taq DNA Polymerase High Fidelity a una temperatura de hibridación de 55°C. Carriles: (1) marcador de peso molecular Leon™, (2) gen *flaA*, pero también se observan varias bandas inespecíficas. **(B)** PCR con la enzima AccuPrime™ *Pfx* DNA Polymerase (carril 2-3) y AccuPrime™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (carril 4-5) a una temperatura de hibridación de 60°C. Carriles: (1) Marcador de peso molecular Leon™, (2-5) amplicón *flaA* y ciertas bandas inespecíficas. **(C)** Producto PCR del gen *flaA* de *B. bacilliformis* CIP 57.18, que fue purificado con el kit comercial QIAquick gel extraction (QUIAGEN), a partir de un agarosa de bajo punto de fusión. Carriles: (1) marcador de peso molecular Leon™ y (2) gen *flaA* purificado. Las flechas indican la banda que corresponde al gen *flaA* de aproximadamente 1128 pb.

#### 4.5. Susceptibilidad antimicrobiana de *B. bacilliformis*

La susceptibilidad microbiana fue estudiada por ser un tema de interés para el tratamiento de la Enfermedad de Carrión. En este estudio se muestran los resultados obtenidos por dos métodos: difusión de disco en placas y el E-test (ver apartado 3.5). Luego de los 15 días de incubación a 28°C, se hicieron las lecturas finales de todas las placas que contenían los discos y las tiras E-test de ciprofloxacino (Cip) y ácido nalidíxico (Nal).

De acuerdo a los resultados obtenidos se encontró que todas las cepas de *B. bacilliformis* (Tabla 2) fueron resistentes a ácido nalidíxico (Nal<sup>R</sup>), debido a que alrededor de los discos utilizados, no se evidenció la formación de halos de inhibición de crecimiento bacteriano. Así mismo, en el caso de las tiras de E-test, tampoco se observó la formación de alguna zona de inhibición elipsoidal y simétrica que cortara la tira, por lo que todas las cepas tuvieron un valor de MIC mayor a 256 µg /mL, siendo por consiguiente catalogadas como resistentes (Tabla 2).

Mientras en el caso de ciprofloxacino, se obtuvo que 3 de las cepas estudiadas de *B. bacilliformis* (CIP 57.17, CIP 57.18 y CIP 57.20) que fueron aisladas previamente a la introducción de las quinolonas en la práctica clínica, es decir antes que se empezara a usar ácido nalidíxico que aproximadamente fue por 1962 y ciprofloxacino a partir de los años 70, presentaban una susceptibilidad disminuida, sin ningún halo de inhibición y con valores de MIC en el rango de 0.125 a 0.25 µg/mL. Con relación a las otras 3 cepas de *B. bacilliformis* (CIP 57.27, CIP 57.19 y 35096) se evidenció que fueron altamente resistentes a ciprofloxacino, dando valores de MIC mayor a 32 µg /mL y ningún halo de inhibición para el caso de las cepas CIP 57.27 y 35096, pero 35 mm con la cepa *B. bacilliformis* CIP 57.19 (Tabla 2).

**Tabla 2.- Antibiograma de las cepas de *B. bacilliformis***

Cepas	Origen	Año	Ácido Nalidíxico		Ciprofloxacino	
			mm <sup>*</sup>	E-test <sup>*</sup>	mm <sup>*</sup>	E-test <sup>*</sup>
CIP 57.17	IP**	1957	0	>256	0	0.25
CIP 57.18	IP	1949	0	>256	0	0.25
CIP 57.19	IP	1941	0	>256	35	>32
CIP 57.20	IP	1957	0	>256	0	0.125
CIP 77.27	IP	1977	0	>256	0	>32
Cli-35096	INS***	2006	0	>256	0	>32

\* Método de difusión por disco, halo medido en milímetros.

\* Concentración Mínima Inhibitoria en µg /mL.

\*\* IP: Instituto Pasteur (Paris, Francia).

\*\*\*INS: Instituto Nacional de Salud (Lima, Peru).

#### 4.6. Amplificación y secuenciación de los genes *gyrA* y *parC* de *B. bacilliformis*

En el caso de los genes *gyrA* y *parC* se amplificó sólo la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR), utilizando los oligonucleótidos que se detallan en la Tabla 3. Para el gen *gyrA* se utilizó los oligonucleótidos descritos en la publicación de Minnick et al. (2003), pero en relación al gen *parC* los oligonucleótidos fueron diseñados a partir de la base de datos disponibles para este gen en el GenBank del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). Para realizar ambas PCR (Figura 20 y 21) se utilizó como molde el DNA genómico de las 6 cepas de *B. bacilliformis* y el kit Expand High Fidelity PCR System (Roche).

Teniendo en cuenta la T<sub>m</sub> de los oligonucleótidos directo y reverso de cada gen, se utilizó 55°C como temperatura de hibridación. Los productos PCR obtenidos fueron resueltos en geles de agarosa al 1% (Figura 20 y 21), observando el amplicón del gen *gyrA* como una banda de 233 pb y el amplicón del gen *parC* como un producto de 328 pb.

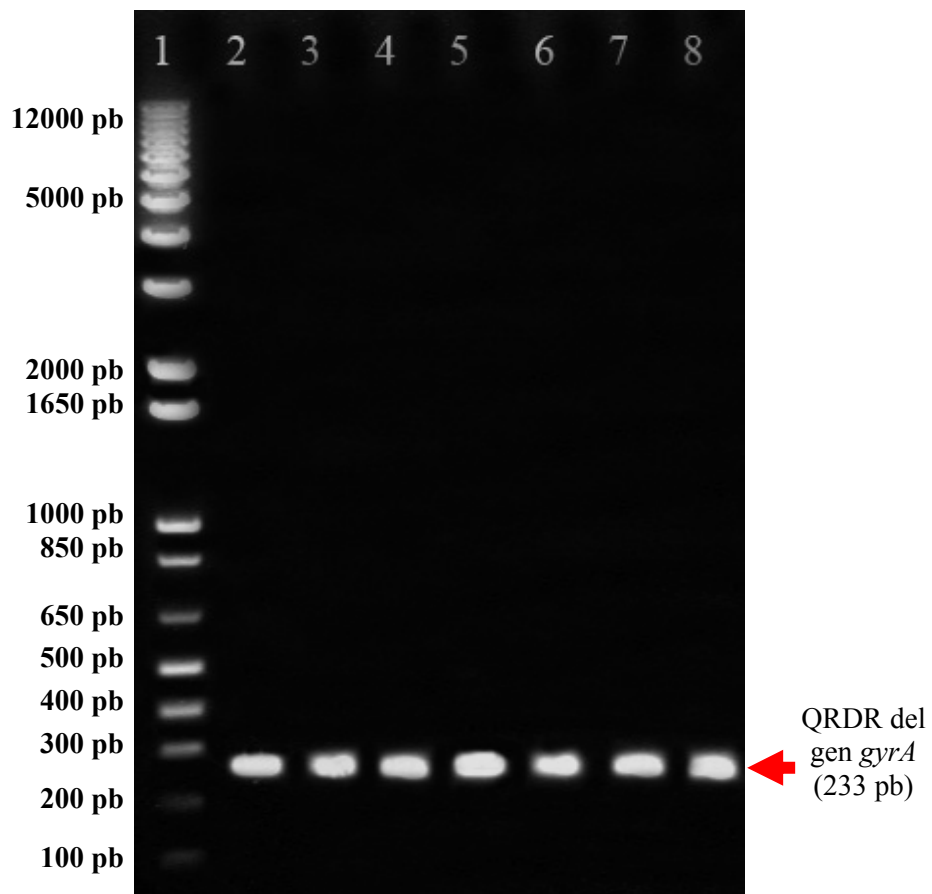


**Tabla 3.-** Oligonucleótidos y condiciones usadas para amplificar la QRDR de los genes *gyrA* y *parC*.

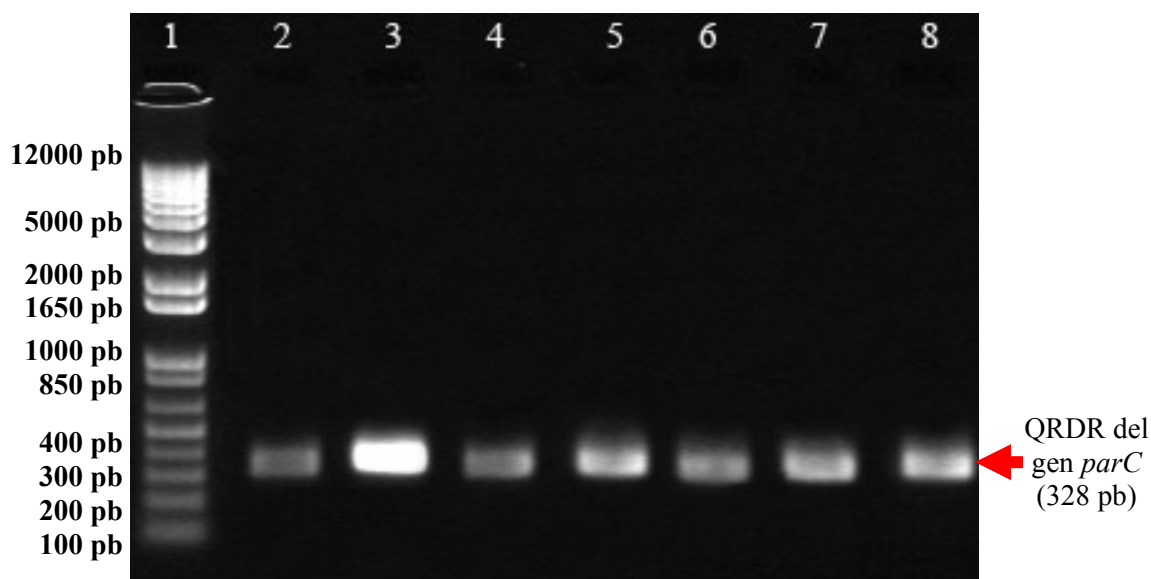
Iniciadores	Secuencia 5'-3'	T <sup>1</sup>	Tamaño del producto de PCR (pb)	Nº <sup>2</sup>	Referencias
F- <i>gyrA</i>	cat gcg atg aat gaa atg gga ctt ttg	55	233	35	Minnick et al., 2003
R- <i>gyrA</i>	aaa cga cat tcc gtg taa cgc atc gc	55		35	Minnick et al., 2003
F- <i>parC</i>	tct tat gct aag tgt gca cgg a	55	328	35	Presente estudio
R- <i>parC</i>	tac caa cag caa tcc ctg aag aa	55		35	Presente estudio

1: Temperatura de hibridación ("annealing").

2: Número de ciclos.



**Figura 20.-** Amplificación por PCR de la QRDR del gen *gyrA* de *B. bacilliformis*, utilizando como molde DNA genómico y la enzima Taq DNA Polymerase High Fidelity. Carriles: (1) marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), (2) *B. bacilliformis* CIP 77.27, (3) *B. bacilliformis* CIP 57.17 (4) *B. bacilliformis* CIP 57.18, (5) *B. bacilliformis* CIP 57.19, (6) *B. bacilliformis* 35096, (7) *B. bacilliformis* CIP 57.20, (8) *B. bacilliformis* CIP 57.18. La flecha señala la QRDR del gen *gyrA* de aproximadamente 233 pb.



**Figura 21.-** PCR de la QRDR del gen *parC* de *B. bacilliformis*, usando DNA genómico y la Taq DNA Polymerase High Fidelity. Carriles: (1) marcador 1Kb plus DNA Ladder, (2) *B. bacilliformis* CIP 77.17, (3) *B. bacilliformis* CIP 57.18 (4) *B. bacilliformis* CIP 57.19, (5) *B. bacilliformis* CIP 57.27, (6) *B. bacilliformis* 35096, (7) *B. bacilliformis* CIP 57.20 y (8) *B. bacilliformis* 35096. La flecha señala la QRDR del gen *parC* de aproximadamente 328 pb.

En la PCR de secuenciación de los genes *gyrA* y *parC* se utilizó 55°C como temperatura de hibridación, por ser la  $T_m$  de los oligonucleótidos utilizados (Tabla 3). Los dos genes fueron secuenciados en ambas direcciones, es decir que con cada gen se realizaron 2 reacciones de PCR, una fue con el oligonucleótido directo y otra con el reverso, con la finalidad de minimizar posibles errores de apareamiento que definitivamente eran escasos por haber utilizado una polimerasa con actividad correctora, como es la Taq High Fidelity.

Las secuencias nucleotídicas obtenidas al amplificar las regiones que contenían las QRDR de los genes *gyrA* y *parC* fueron copiadas en formato FASTA a partir del editor de alineamiento de secuencias BioEdit (Hall, 1999), y posteriormente introducidas una a una de forma independiente en la web del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) en el link BLAST, en donde fueron comparadas y alineadas con la base de datos de nucleótidos disponibles para estos dos genes en el GenBank, utilizando para ello el algoritmo megablast. De estos alineamientos se verificó que dichas secuencias formaban parte de los genes *gyrA* (2787 pb que codifican 928 aminoácidos) y *parC* (2238 pb que codifican 745 aminoácidos), ya que la QRDR de *gyrA* estaba ubicado entre la base 171 al 407, en cambio la QRDR del gen *parC* se ubicaba entre la base 190 al 548 (Figura 22 - 24).

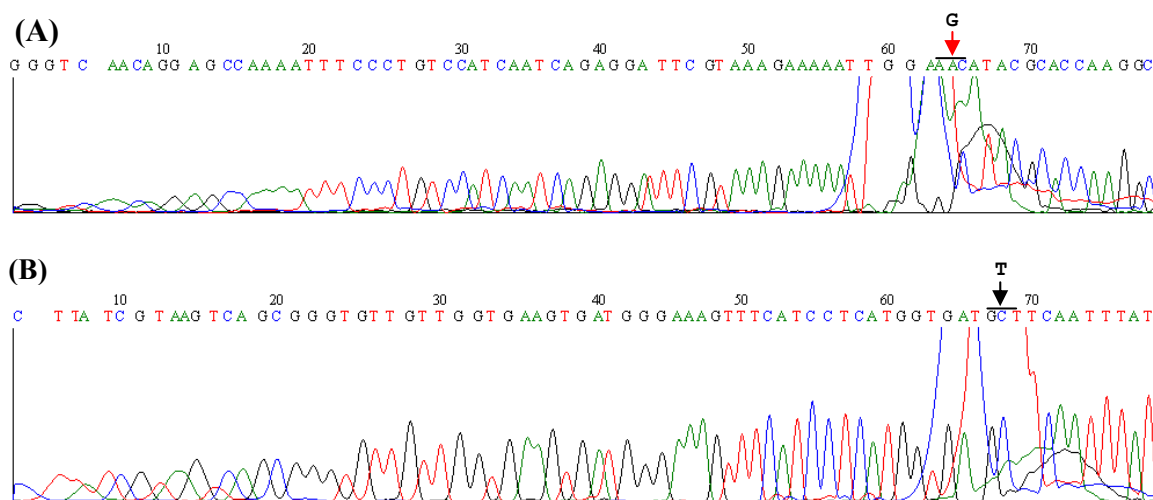
<i>B.bacilliformis</i> 35096	1	-----TCATGCGATGAATGAAATGGGAC	30
<i>B.bacilliformis</i> CIP 57.17	1	-----TCATGCGATGAATGAAATGGGAC	30
<i>B.bacilliformis</i> CIP 57.18	1	-----TCATGCGATGAATGAAATGGGAC	30
<i>B.bacilliformis</i> CIP 57.19	1	-----TCATGCGATGAATGAAATGGGAC	30
<i>B.bacilliformis</i> CIP 57.20	1	-----TCATGCGATGAATGAAATGGGAC	30
<i>B.bacilliformis</i> CIP 57.27	1	-----TCATGCGATGAATGAAATGGGAC	30
<i>B.bacilliformis</i> KC583	151	CCTGTCCATCGGCGCATTC	200
Clustal Consensus	1	*****	30
<i>B.bacilliformis</i> 35096	31	CAATAAGCCTTATCGTAAGTCAGCGGGTGTTGTTGGTGAAGTGATGGGAA	80
<i>B.bacilliformis</i> CIP 57.17	31	CAATAAGCCTTATCGTAAGTCAGCGGGTGTTGTTGGTGAAGTGATGGGAA	80
<i>B.bacilliformis</i> CIP 57.18	31	CAATAAGCCTTATCGTAAGTCAGCGGGTGTTGTTGGTGAAGTGATGGGAA	80
<i>B.bacilliformis</i> CIP 57.19	31	CAATAAGCCTTATCGTAAGTCAGCGGGTGTTGTTGGTGAAGTGATGGGAA	80
<i>B.bacilliformis</i> CIP 57.20	31	CAATAAGCCTTATCGTAAGTCAGCGGGTGTTGTTGGTGAAGTGATGGGAA	80
<i>B.bacilliformis</i> CIP 57.27	31	CAATAAGCCTTATCGTAAGTCAGCGGGTGTTGTTGGTGAAGTGATGGGAA	80
<i>B.bacilliformis</i> KC583	201	CAATAAGCCTTATCGTAAGTCAGCGGGTGTTGTTGGTGAAGTGATGGGAA	250
Clustal Consensus	31	*****	80
<i>B.bacilliformis</i> 35096	81	AGTTTCATCCTCATGGTGATGCTTCAATTTATGATGCCTTGGTGCGTATG	130
<i>B.bacilliformis</i> CIP 57.17	81	AGTTTCATCCTCATGGTGATGCTTCAATTTATGATGCCTTGGTGCGTATG	130
<i>B.bacilliformis</i> CIP 57.18	81	AGTTTCATCCTCATGGTGATGCTTCAATTTATGATGCCTTGGTGCGTATG	130
<i>B.bacilliformis</i> CIP 57.19	81	AGTTTCATCCTCATGGTGATGCTTCAATTTATGATGCCTTGGTGCGTATG	130
<i>B.bacilliformis</i> CIP 57.20	81	AGTTTCATCCTCATGGTGATGCTTCAATTTATGATGCCTTGGTGCGTATG	130
<i>B.bacilliformis</i> CIP 57.27	81	AGTTTCATCCTCATGGTGATGCTTCAATTTATGATGCCTTGGTGCGTATG	130
<i>B.bacilliformis</i> KC583	251	AGTTTCATCCTCATGGTGATGCTTCAATTTATGATGCCTTGGTGCGTATG	300
Clustal Consensus	81	*****	128
		91 95	
<i>B.bacilliformis</i> 35096	131	GCACAGGATTTTTCTTTACGAAATCCCTCTGATTGATGGACAGGGAAATTT	180
<i>B.bacilliformis</i> CIP 57.17	131	GCACAGGATTTTTCTTTACGAAATCCCTCTGATTGATGGACAGGGAAATTT	180
<i>B.bacilliformis</i> CIP 57.18	131	GCACAGGATTTTTCTTTACGAAATCCCTCTGATTGATGGACAGGGAAATTT	180
<i>B.bacilliformis</i> CIP 57.19	131	GCACAGGATTTTTCTTTACGAAATCCCTCTGATTGATGGACAGGGAAATTT	180
<i>B.bacilliformis</i> CIP 57.20	131	GCACAGGATTTTTCTTTACGAAATCCCTCTGATTGATGGACAGGGAAATTT	180
<i>B.bacilliformis</i> CIP 57.27	131	GCACAGGATTTTTCTTTACGAAATCCCTCTGATTGATGGACAGGGAAATTT	180
<i>B.bacilliformis</i> KC583	301	GCACAGGATTTTTCTTTACGAAATCCCTCTGATTGATGGACAGGGAAATTT	350
Clustal Consensus	129	*****	178
<i>B.bacilliformis</i> 35096	181	TGGCTCTGTTGACGGTGATCCACCCGCAGCGATGGGTT-ACACTAAATG	229
<i>B.bacilliformis</i> CIP 57.17	181	TGGCTCTGTTGACGGTGATCCACCCGCAGCGATG-GTTTACACGGAAATG	229
<i>B.bacilliformis</i> CIP 57.18	181	TGGCTCTGTTGATGGTGATCCACCCGCAGCGATGGGTT-ACACAAATG	229
<i>B.bacilliformis</i> CIP 57.19	181	TGGCTCTGTTGATGGTGATCCACCCGCAGCGATGGGTT-ACACTAAATG	229
<i>B.bacilliformis</i> CIP 57.20	181	TGGCTCTGTTGATGGTGATCCACCCGCAGCGATGCGTTTACACTGAA-TG	229
<i>B.bacilliformis</i> CIP 57.27	181	TGGCTCTGTTGACGGTGATCCACCCGCAGCGATG-GTTTACACGGAA-TG	228
<i>B.bacilliformis</i> KC583	351	TGGCTCTGTTGACGGTGATCCACCCGCAGCGATGCGTT-ACACGGAA-TG	398
Clustal Consensus	179	*****	222
<i>B.bacilliformis</i> 35096	230	TCGTT-----	234
<i>B.bacilliformis</i> CIP 57.17	230	TCGTT-----	234
<i>B.bacilliformis</i> CIP 57.18	230	TCGTTTA-----	236
<i>B.bacilliformis</i> CIP 57.19	230	TCGTT-----	234
<i>B.bacilliformis</i> CIP 57.20	230	TCGTTTA-----	236
<i>B.bacilliformis</i> CIP 57.27	229	TCGTTTA-----	235
<i>B.bacilliformis</i> KC583	399	TCGTTTAGAAAAAGTTGCAGAAGACTTTTAGCTGATATTGATAAAGATA	448
Clustal Consensus	223	*****	227

**Figura 22.-** Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas de la QRDR del gen *gyrA* de las cepas de *B. bacilliformis* del Instituto Pasteur (CIP 57.17, CIP 57.18, CIP 57.19, CIP 57.20 y CIP 57.27), cepa clínica *B. bacilliformis* 35096 y *B. bacilliformis* KC583 del GenBank, usando CLUSTALW y Bioedit. En amarillo-plomo se resalta el codón de la posición 91, que codifica para una alanina excepto en la cepa *B. bacilliformis* 35096 en donde el cambio del triplete GCT o GCG por el GTT da origen a una valina, y sólo en amarillo se destaca el codón en posición 95 que codifica para un ácido aspártico.

Además, como se había secuenciado por ambos lados, antes de realizar los alineamientos múltiples con las 6 secuencias nucleotídicas de las QRDR de cada gen (*gyrA* y *parC*) y la secuencia total de dichos genes insertos en la base del genoma completo de *B. bacilliformis* KC583 (N° de accesoión CP000524), se busco la

secuencia consenso entre las secuencias nucleotídicas obtenidas con el oligonucleótido directo y el reverso, para lo cual se utilizó el programa CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>). Con las secuencias consenso se hicieron los alineamientos múltiples empleando la matriz de similitud BLOSUM62 y el programa ClustalW (Thompson et al., 1994), después los alineamientos obtenidos fueron editados mediante los programas Bioedit o Boxshade ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)) (Figura 22 - 24).

En relación al QRDR del gen *gyrA* se encontró porcentajes de identidad de 97% (*B. bacilliformis* CIP 57.18, *B. bacilliformis* CIP 57.19, *B. bacilliformis* 35096), 98% (*B. bacilliformis* CIP 57.17, *B. bacilliformis* CIP 57.20) y 99% (*B. bacilliformis* CIP 57.27) cuando se hicieron las comparaciones y alineamientos con el gen *gyrA* de la cepa *B. bacilliformis* KC583 (N° de accesoión CP000524) (Figura 22). Para la QRDR del gen *parC* se obtuvo un porcentaje de identidad del 99% con todas las cepas trabajadas, cuando se comparó y alineó las secuencias obtenidas de esta región y el gen *parC* de la cepa *B. bacilliformis* KC583 (Figura 24). El cromatograma de la secuencia nucleotídica de la QRDR del gen *gyrA* se muestra en la Figura 23.



**Figura 23.-** Parte de los cromatogramas de las secuencias nucleotídicas de la QRDR del gen *gyrA* de *B. bacilliformis*. **(A)** QRDR de *B. bacilliformis* 35096, obtenido al secuenciar con el oligonucleótido reverso. La flecha roja señala el triplete AAC presente en lugar del triplete AGC, debido al cambio de una guanina por una adenina que en la hebra complementaria origina la aparición de un GTT en lugar de GCT (señalado con la flecha negra). **(B)** QRDR de *B. bacilliformis* CIP 57.17 obtenido al secuenciar con el oligonucleótido directo. La flecha negra señala el triplete GCT que no está presente en *B. bacilliformis* 35096 en donde se encontró al triplete GTT que en la hebra complementaria corresponde al triplete AAC (flecha roja).

```

B. bacilliformis CIP 57.17 1 -----TCTTATGCCTA 11
B. bacilliformis CIP 57.18 1 -----TCTTATGCCTA 11
B. bacilliformis CIP 57.19 1 -----TCTTATGCCTA 11
B. bacilliformis CIP 57.20 1 -----TCTTATGCCTA 11
B. bacilliformis CIP 57.27 1 -----TCTTATGCCTA 11
B. bacilliformis 35096 1 -----TCTTATGCCTA 11
B. bacilliformis KC583 151 ATCCATGCCATGCGCTTATTAAACTTAACCCGCAAACTCTTATGCTAA 200
Clustal Consensus 1 ***** 9

B. bacilliformis CIP 57.17 12 GTGTGCACGGATTGTAGGTGATGTTATGGGGAAATTTTCATCCTCATGGTG 61
B. bacilliformis CIP 57.18 12 GTGTGCACGGATTGTAGGTGATGTTATGGGGAAATTTTCATCCTCATGGTG 61
B. bacilliformis CIP 57.19 12 GTGTGCACGGATTGTAGGTGATGTTATGGGGAAATTTTCATCCTCATGGTG 61
B. bacilliformis CIP 57.20 12 GTGTGCACGGATTGTAGGTGATGTTATGGGGAAATTTTCATCCTCATGGTG 61
B. bacilliformis CIP 57.27 12 GTGTGCACGGATTGTAGGTGATGTTATGGGGAAATTTTCATCCTCATGGTG 61
B. bacilliformis 35096 12 GTGTGCACGGATTGTAGGTGATGTTATGGGGAAATTTTCATCCTCATGGTG 61
B. bacilliformis KC583 201 GTGTGCACGGATTGTAGGTGATGTTATGGGGAAATTTTCATCCTCATGGTG 250
Clustal Consensus 10 ***** 59

B. bacilliformis CIP 57.17 62 ATGCCCTCTATTATGATGCATTAGTTTCGTTTGGCACAGGACTTTGCTGTC 111
B. bacilliformis CIP 57.18 62 ATGCCCTCTATTATGATGCATTAGTTTCGTTTGGCACAGGACTTTGCTGTC 111
B. bacilliformis CIP 57.19 62 ATGCCCTCTATTATGATGCATTAGTTTCGTTTGGCACAGGACTTTGCTGTC 111
B. bacilliformis CIP 57.20 62 ATGCCCTCTATTATGATGCATTAGTTTCGTTTGGCACAGGACTTTGCTGTC 111
B. bacilliformis CIP 57.27 62 ATGCCCTCTATTATGATGCATTAGTTTCGTTTGGCACAGGACTTTGCTGTC 111
B. bacilliformis 35096 62 ATGCCCTCTATTATGATGCATTAGTTTCGTTTGGCACAGGACTTTGCTGTC 111
B. bacilliformis KC583 251 ATGCCCTCTATTATGATGCATTAGTTTCGTTTGGCACAGGACTTTGCTGTC 300
Clustal Consensus 60 ***** 109
85 89

B. bacilliformis CIP 57.17 112 CGTTATCCATTAAATTGATGGACAAGGAAATTTTCGGTAATATCGACGGTGA 161
B. bacilliformis CIP 57.18 112 CGTTATCCATTAAATTGATGGACAAGGAAATTTTCGGTAATATCGACGGTGA 161
B. bacilliformis CIP 57.19 112 CGTTATCCATTAAATTGATGGACAAGGAAATTTTCGGTAATATCGACGGTGA 161
B. bacilliformis CIP 57.20 112 CGTTATCCATTAAATTGATGGACAAGGAAATTTTCGGTAATATCGACGGTGA 161
B. bacilliformis CIP 57.27 112 CGTTATCCATTAAATTGATGGACAAGGAAATTTTCGGTAATATCGACGGTGA 161
B. bacilliformis 35096 112 CGTTATCCATTAAATTGATGGACAAGGAAATTTTCGGTAATATCGACGGTGA 161
B. bacilliformis KC583 301 CGTTATCCATTAAATTGATGGACAAGGAAATTTTCGGTAATATCGACGGTGA 350
Clustal Consensus 110 ***** 159

C B. bacilliformis IP 57.17 162 TAATGCTGCAGCTATGCGTTATACAGAAGCAGCATGACTGAAGTAGCAG 211
B. bacilliformis CIP 57.18 162 TAATGCTGCAGCTATGCGTTATACAGAAGCAGCATGACTGAAGTAGCAG 211
B. bacilliformis CIP 57.19 162 TAATGCTGCAGCTATGCGTTATACAGAAGCAGCATGACTGAAGTAGCAG 211
B. bacilliformis CIP 57.20 162 TAATGCTGCAGCTATGCGTTATACAGAAGCAGCATGACTGAAGTAGCAG 211
B. bacilliformis CIP 57.27 162 TAATGCTGCAGCTATGCGTTATACAGAAGCAGCATGACTGAAGTAGCAG 211
B. bacilliformis 35096 162 TAATGCTGCAGCTATGCGTTATACAGAAGCAGCATGACTGAAGTAGCAG 211
B. bacilliformis KC583 351 TAATGCTGCAGCTATGCGTTATACAGAAGCAGCATGACTGAAGTAGCAG 400
Clustal Consensus 160 ***** 209

B. bacilliformis CIP 57.17 212 AATTGTTACTTGAGGGTATCAACGAAAAATGCTATTGATTTTCGTTTAACT 261
B. bacilliformis CIP 57.18 212 AATTGTTACTTGAGGGTATCAACGAAAAATGCTATTGATTTTCGTTTAACT 261
B. bacilliformis CIP 57.19 212 AATTGTTACTTGAGGGTATCAACGAAAAATGCTATTGATTTTCGTTTAACT 261
B. bacilliformis CIP 57.20 212 AATTGTTACTTGAGGGTATCAACGAAAAATGCTATTGATTTTCGTTTAACT 261
B. bacilliformis CIP 57.27 212 AATTGTTACTTGAGGGTATCAACGAAAAATGCTATTGATTTTCGTTTAACT 261
B. bacilliformis 35096 212 AATTGTTACTTGAGGGTATCAACGAAAAATGCTATTGATTTTCGTTTAACT 261
B. bacilliformis KC583 401 AATTGTTACTTGAGGGTATCAACGAAAAATGCTATTGATTTTCGTTTAACT 450
Clustal Consensus 210 ***** 259

B. bacilliformis CIP 57.17 262 TATAATGAAGAAGATGAAGAGCCTATTGTTTTACCAGGAGCTTTTCCTAA 311
B. bacilliformis CIP 57.18 262 TATAATGAAGAAGATGAAGAGCCTATTGTTTTACCAGGAGCTTTTCCTAA 311
B. bacilliformis CIP 57.19 262 TATAATGAAGAAGATGAAGAGCCTATTGTTTTACCAGGAGCTTTTCCTAA 311
B. bacilliformis CIP 57.20 262 TATAATGAAGAAGATGAAGAGCCTATTGTTTTACCAGGAGCTTTTCCTAA 311
B. bacilliformis CIP 57.27 262 TATAATGAAGAAGATGAAGAGCCTATTGTTTTACCAGGAGCTTTTCCTAA 311
B. bacilliformis 35096 262 TATAATGAAGAAGATGAAGAGCCTATTGTTTTACCAGGAGCTTTTCCTAA 311
B. bacilliformis KC583 451 TATAATGAAGAAGATGAAGAGCCTATTGTTTTACCAGGAGCTTTTCCTAA 500
Clustal Consensus 260 ***** 309

B. bacilliformis CIP 57.17 312 TCTTTTAGCCAATGGTTCTTCAGGGATTGCTGTTGGTA----- 349
B. bacilliformis CIP 57.18 312 TCTTTTAGCCAATGGTTCTTCAGGGATTGCTGTTGGTA----- 349
B. bacilliformis CIP 57.19 312 TCTTTTAGCCAATGGTTCTTCAGGGATT-CTGTTGGTA----- 348
B. bacilliformis CIP 57.20 312 TCTTTTAGCCAATGGTTCTTCAGGGATTGCTGTTGGTA----- 349
B. bacilliformis CIP 57.27 312 TCTTTTAGCCAATGGTTCTTCAGGGATT-CTGTTGGTA----- 348
B. bacilliformis 35096 312 TCTTTTAGCCAATGGTTCTTCAGGGATTGCTGTTGGTA----- 349
B. bacilliformis KC583 501 TCTTTTAGCCAATGGTTCTTCAGGGATTGCTGTTGGTATGGCAACATCTA 550
Clustal Consensus 310 ***** 346

```

**Figura 24.-** Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas de la QRDR del gen *parC* de las cepas *B. bacilliformis* del Instituto Pasteur (CIP 57.17, CIP 57.18, CIP 57.19, CIP 57.20 y CIP 57.27), cepa clínica *B. bacilliformis* 35096 y *B. bacilliformis* KC583 del GenBank, usando CLUSTALW y Bioedit. En amarillo se resalta el codón de la posición 85 que codifica para una alanina y en plomo el codón de la posición 89 que codifica el aminoácido ácido aspártico, ambos comunes a todas las secuencias.

Cuando las regiones determinantes de resistencia a quinolonas (QRDR) de los genes *gyrA* y *parC* de las 6 cepas de *B. bacilliformis* fueron analizadas, no se encontró ningún cambio, excepto en la cepa clínica *B. bacilliformis* 35096, en la cual se observó el cambio del triplete GCT por el de GTT (Figura 22), lo que da como resultado el reemplazo de una alanina (Ala = A) por una valina (Val = V) en el aminoácido en posición 91 del gen *gyrA* (Tabla 4). Aunque estudios previos analizando *in vitro* mutantes de *B. bacilliformis* resistentes al antibiótico ciprofloxacino, habían mostrado la presencia de sustituciones en la proteína GyrA (Minnick et al., 2003; Biswas et al., 2007), este es el primer reporte de una sustitución en la QRDR de GyrA en un aislado clínico de *B. bacilliformis* resistente a ciprofloxacino. Además, en previos estudios *in vitro*, las sustituciones fueron encontradas en los aminoácidos ubicados en la posición 90 y 95, en donde se observa la presencia de un ácido aspártico (Asp = D) como el aminoácido silvestre según la base de datos del GenBank del NCBI (Minnick et al., 2003; Biswas et al., 2007). Por lo tanto, esta es la primera descripción de una sustitución que afecta el codón del aminoácido 91 del gen *gyrA*.

Con relación a la QRDR del gen *parC* (Figura 24) no se evidenció ninguna alteración en los tripletes de nucleótidos (Tabla 4), que generalmente al ser un blanco de las quinolonas, sufren mutaciones puntuales que se expresan como un mecanismo de resistencia, es decir que los aminoácidos de las posiciones 85 y 89, que son los equivalentes a los presentes en las numeraciones 80 y 84 respectivamente en *E. coli*, no sufrieron ningún cambio, encontrando en la posición 85 a una alanina y en la 89 a un ácido aspártico, que son los aminoácidos característicos en una cepa silvestre según la base de datos del GenBank del NCBI.

**Tabla 4.-** Características de las mutaciones de las QRDR de los genes *gyrA* y *parC* de las cepas de *B. bacilliformis*

Cepas	Origen	Año	<i>gyrA</i>		<i>parC</i>	
			91	95	85	89
GeneBank			Ala (A)	Asp (D)	Ala (A)	Asp (D)
CIP 57.17	IP**	1957	---	---	---	---
CIP 57.18	IP	1949	---	---	---	---
CIP 57.19	IP	1941	---	---	---	---
CIP 57.20	IP	1957	---	---	---	---
CIP 77.27	IP	1977	---	---	---	---
Cli-35096	INS***	2006	Val (V)	---	---	---

\*\* IP: Instituto Pasteur (Paris, Francia).

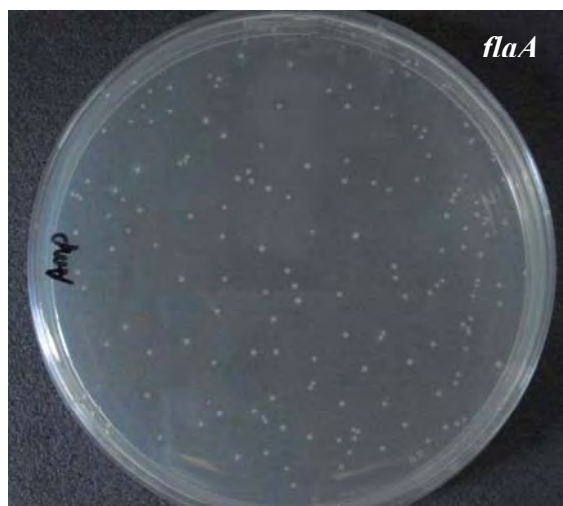
\*\*\*INS: Intituto Nacional de Salud (Lima, Peru).

#### 4.7. Aislamiento y clonación de los fragmentos amplificados de los genes *ialB* y *flaA* de *B. bacilliformis*

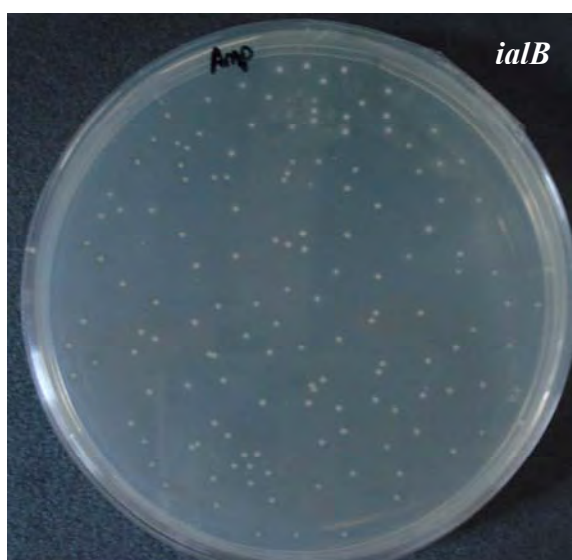
Los amplicones de los genes *ialB* y *flaA* de la cepa *B. bacilliformis* CIP 57.18 obtenidos con la enzima AccuPrime<sup>TM</sup> Pfx DNA polymerase (que genera productos de PCR con extremos truncos), luego de ser purificados con los kits comerciales Purelink<sup>TM</sup> PCR Purification (Invitrogen) y QUIAquick Gel Extraction (QUIAGEN), fueron cuantificados al espectrofotómetro a 260 nm en celdas de cuarzo de 200 µL, para saber que proporción poner en el ensayo de clonamiento al mezclarlo con el vector pET101/D-TOPO® (Invitrogen, 2006), ya que debían estar en una proporción de radio molar de 0.5:1 a 2:1 el gen a clonar con el vector TOPO, es así que se colocó 1 µL de amplicón con 1 µL de vector.

Las células *E. coli* One Shot TOP10 químicamente competentes (50 µL) que fueron transformadas con 3 µL de reacción de clonación, fueron sembradas en volúmenes de 50, 100 y 150 µL sobre placas con agar LB suplementado con ampicilina a una concentración de 100 µg/mL de medio. Las colonias que crecieron en cada placa luego de la incubación (Figura 25 y 26), fueron todas enumeradas. De

cada ensayo de transformación, al azar se seleccionó 15 colonias para analizarlas por PCR.



**Figura 25.-** Colonias de *E. coli* One Shot TOP10 transformantes que llevan el plásmido pET101- *flaA* que tiene el inserto *flaA* de *B. bacilliformis* CIP 57.18. Placa de agar Luria Bertani conteniendo Ampicilina a una concentración de 100 µg/mL de medio, que fue sembrada con 100 µL de células transformantes.



**Figura 26.-** Colonias de *E. coli* One Shot TOP10 transformantes que llevan el plásmido pET101- *ialB* que tiene el inserto *ialB* de *B. bacilliformis* CIP 57.18. Placa de agar Luria Bertani conteniendo Ampicilina a una concentración de 100 µg/mL de medio, que fue sembrada con 100 µL de células transformantes.

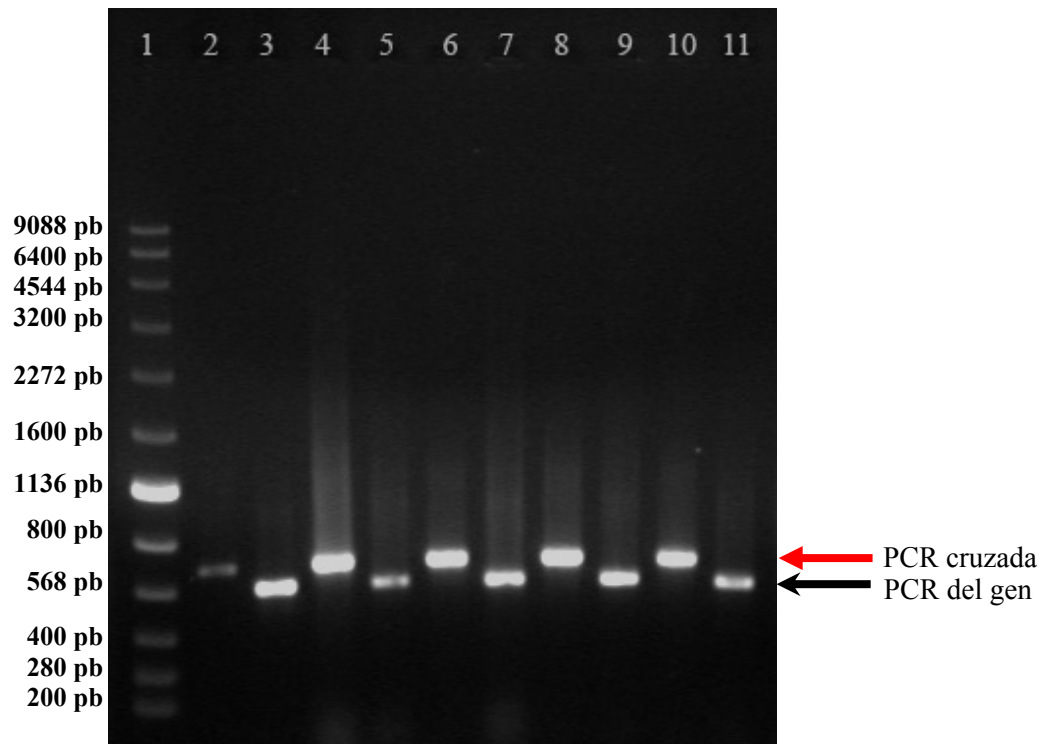


Las colonias transformantes seleccionadas fueron analizadas mediante PCR de colonia con la enzima AccuPrime™ Taq DNA polymerase High Fidelity (Invitrogen). Para cada clon elegido se realizó una PCR del gen, utilizando para ello sus respectivos oligonucleótidos directo y reverso, y también una PCR cruzada en donde se empleó el oligonucleótido directo del vector T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') y el oligonucleótido reverso del gen analizado (Figura 27 y 28). Esta PCR permitió establecer si el gen clonado se encontraba insertado con un marco de lectura correcto.

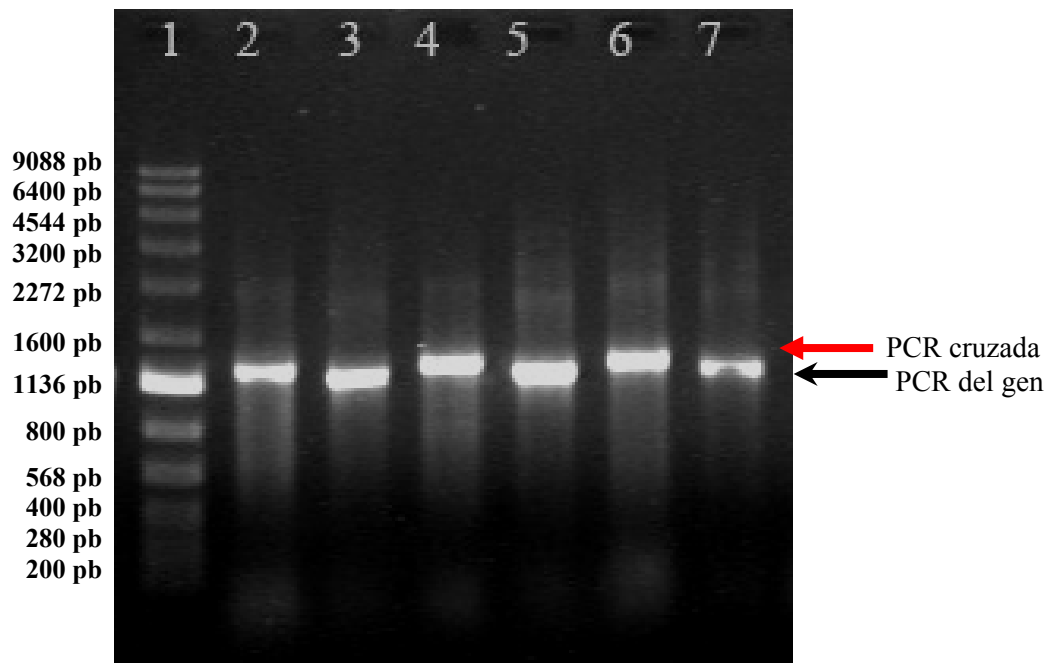
Los ciclos empleados para el PCR del gen y PCR cruzado de cada clon, fueron los mismos que los utilizados para la amplificación del gen a partir de DNA genómico; es decir, como temperaturas de hibridación se usó 58°C y 60°C para el gen *ialB* y *flaA*, respectivamente, puesto que la Tm de los oligonucleótidos del vector T7 permitía trabajar sin problemas a esas temperaturas.

Los clones que amplificaron con ambas PCR (PCR del gen y PCR cruzada) fueron identificados como clones que tenían el gen *ialB* o *flaA* insertado en correcto marco de lectura en el vector pET101/D-TOPO (5753 pb), formando de esa manera los plásmidos pET101-*ialB* y pET101-*flaA*.

Con el gen *ialB* se obtuvieron 5 clones que fueron las colonias transformantes numeradas como 1, 9, 19, 29 y 36 (Figura 27); y con el gen *flaA* se consiguió 7 clones que fueron el 1, 2, 4, 5, 6, 11 y 12 (Figura 28). En la PCR cruzada con el oligonucleótido directo del vector T7, el gen de interés incrementó su tamaño en aproximadamente 100 pb debido a la amplificación de una parte del vector plasmídico.



**Figura 27.-** Amplificación del gen *ialB* a partir de colonias transformantes de *E. coli* Top10. Carriles: (1) marcador, (2, 4, 6, 8 y 10) productos de la PCR cruzada de los clones 1, 9, 19, 29 y 36, (3, 5, 7, 9 y 11) productos de la PCR del gen de los clones 1, 9, 19, 29 y 36. La flecha roja señala los amplicones de aproximadamente 668 pb obtenidos con la PCR cruzada y la flecha negra indica los amplicones de 558 pb resultantes de la PCR del gen.

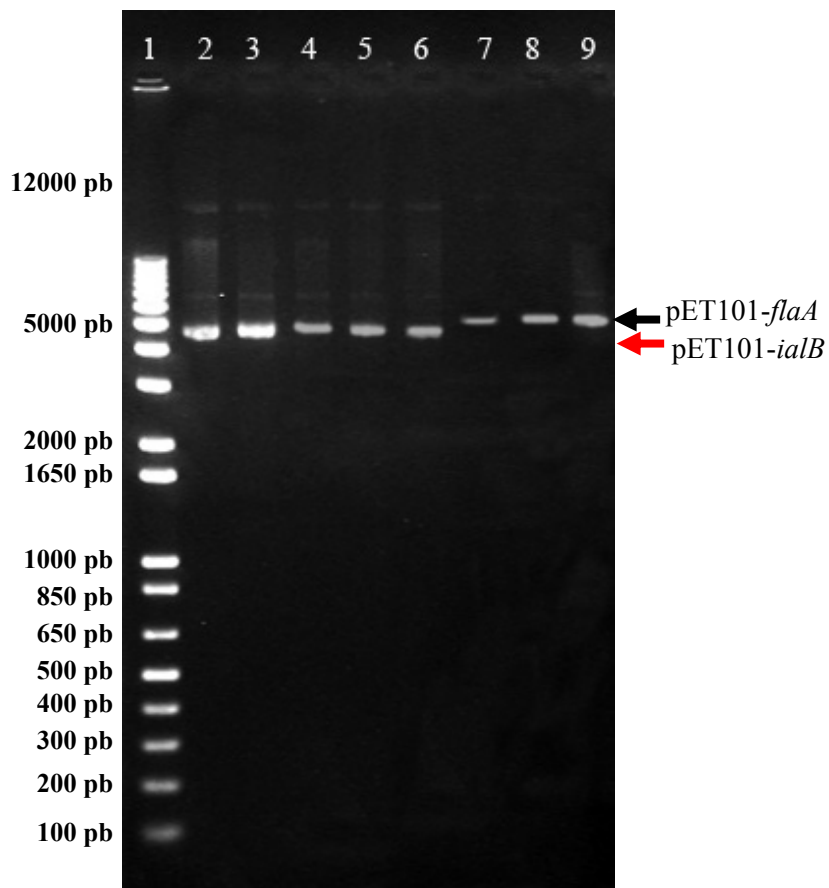


**Figura 28.-** Amplificación del gen *flaA* a partir de colonias transformantes de *E. coli* Top10. Carriles: (1) marcador, (2, 4 y 6) productos de la PCR cruzada de los clones 2, 6 y 12, (3, 5 y 7) productos de la PCR del gen de los clones 2, 6 y 12. La flecha roja señala los amplicones de aproximadamente 1228 pb obtenidos con la PCR cruzada y la flecha negra indica los amplicones de 1128 pb resultantes de la PCR del gen.

#### 4.8. Purificación de DNA plasmídico

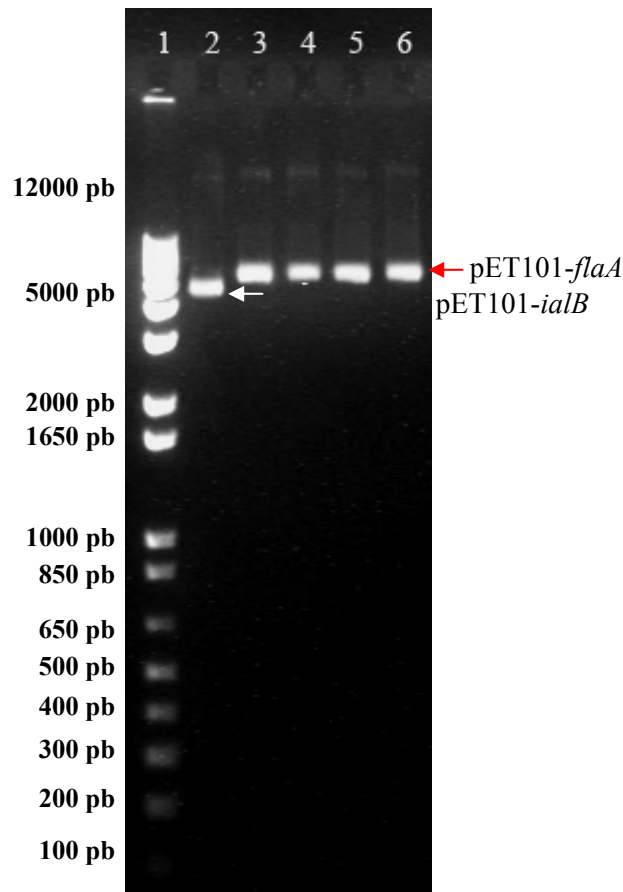
A partir de los clones 1, 9, 19, 29 y 36 del gen *ialB* y los clones 1, 2, 4, 5, 6, 11 y 12 del gen *flaA*, se realizaron las extracciones de los plásmidos pET101-*ialB* y pET101-*flaA* con los kits comerciales PureLink™ Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen) y QIAprep® Miniprep (QUIAGEN), las cuales fueron cuantificadas al espectrofotómetro. Según las cuantificaciones plasmídicas, se obtuvo que las muestras preparadas con el kit QIAprep® Miniprep (QUIAGEN) fueron las que estaban más puras y concentradas (30 – 40 ng DNA/ µL).

La calidad y pureza de los plásmidos purificados fueron evaluados en geles de agarosa al 1%, en donde se cargó cada una de las muestras de DNA plasmídico (Figuras 29 y 30). La mejor pureza e integridad fue obtenida con el kit QIAprep® Miniprep (QUIAGEN) (Figura 30). En el caso de las muestras obtenidas con el kit Purelink Quick Plasmid Miniprep se observó más de una banda en cada carril (Figura 29), posiblemente debido a roturas en la doble hebra covalentemente cerrada del plásmido que ocasiona la presencia de las conformaciones atípicas que son la circular abierta y lineal según se haya afectado a una o a las dos hebras del DNA. Además el tamaño de cada uno de estas bandas estaba por encima o debajo del tamaño esperado del plásmido que era aproximadamente 6311 pb y 6881 pb, según se tratase de los plásmidos pET101-*ialB* o pET101-*flaA* respectivamente, es así que la banda más prominente y notoria que correspondería a la forma circular covalentemente cerrada o superenrollada de pET101-*ialB*, se ubicaba por debajo de la banda de 5000 pb del marcador utilizado y en el caso del plásmido pET101-*flaA*, esta banda estaba un poco más arriba de los 5000 pb según el marcador (Figura 29).



**Figura 29.-** Muestras de DNA plasmídico obtenido con el kit Purelink Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen) de las cepas *E. coli* TOP10. Carriles: (1) marcador, (2-6) plásmidos pET101-*ialB* de clones 1, 9, 19, 29 y 36 respectivamente de *E. coli* TOP10 (7-9) plásmidos pET101-*flaA* de los clones 2, 6, y 12 respectivamente de *E. coli*. La flecha roja señala los plásmidos pET101-*ialB* y la flecha negra indica los plásmidos pET101-*flaA*.

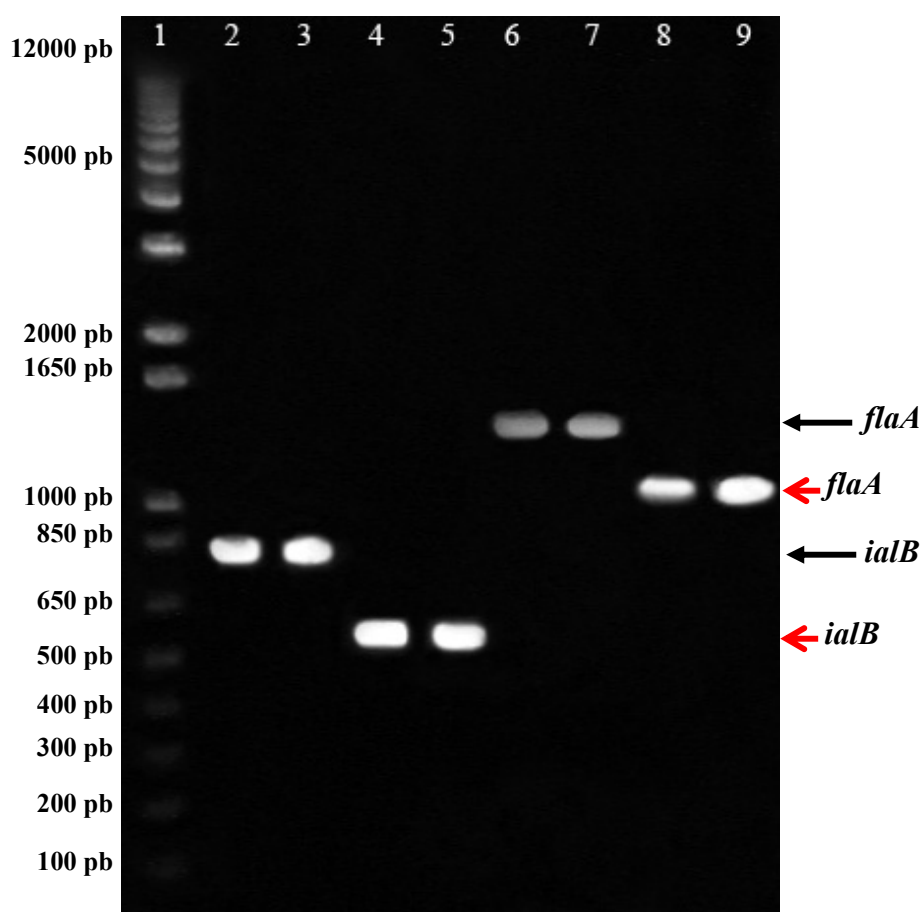
En el gel donde se cargó las muestras de DNA plasmídico obtenidas con el kit QIAprep Spin Miniprep (Figura 30) se pudo observar una banda muy tenue cercana a los 12 kpb y la presencia mayoritaria de una banda muy intensa que correspondería a la forma superenrollada, la misma que estaba más cerca a los pesos esperados del plásmido pET101-*ialB* (6311 pb) y pET101-*flaA* (6881).



**Figura 30.-** Muestras de DNA plasmídico obtenido con el kit QIAprep Spin Miniprep (QUIAGEN) de las cepas *E. coli* TOP10. Carriles: (1) marcador, (2) plásmidos pET101-*ialB* del clon 29 de *E. coli* TOP10, (3-6) plásmidos pET101-*flaA* de los clones 1, 2, 6 y 12 respectivamente de *E. coli* TOP10. La flecha roja señala los plásmidos pET101-*flaA* y la flecha blanca indica el plásmido pET101-*ialB*.

Posteriormente para constatar que dentro de los plásmidos pET101-*ialB* y pET101-*flaA* realmente se encontraban insertados los genes *ialB* y *flaA*, se hicieron reacciones de PCR de 10 µL de volumen final con el kit Expand High Fidelity PCR System (Roche) usando estos plásmidos como molde y los oligonucleótidos directo y reverso de cada uno de los genes, así como los oligonucleótidos directo (5'-taatacgactcactataggg-3') y reverso (5'-tagttattgctcagcggtgg-3') del vector T7 (Figura 31). Con los oligonucleótidos del gen o del vector T7 se usó temperaturas de hibridación de 58°C y 60°C para amplificar los genes *ialB* y *flaA* respectivamente. Los productos PCR obtenidos fueron corridos en un gel de agarosa al 1%, en el cual los amplicones de los genes *ialB* y *flaA* daban el peso esperado de 558 pb y 1128 pb

respectivamente, los mismos que incrementaron su tamaño en aproximadamente 266 pb cuando se utilizó los oligonucleótidos del vector T7 debido a que también se amplificó una parte del plásmido, por lo que se presentaban como amplicones de aproximadamente 824 pb en el caso del gen *ialB* y de 1394 pb para el gen *flaA* (Figura 31).



**Figura 31.-** Amplificación por PCR de los genes *ialB* y *flaA* a partir de los plásmidos pET101-*ialB* y pET101-*flaA*. Carriles: (1) marcador, (2-3) gen *ialB* amplificado con los oligonucleótidos del vector T7 usando como molde el DNA plasmídico de los clones 29 y 36, (4-5) gen *ialB* amplificado con los oligonucleótidos del gen usando como molde el DNA plasmídico de los clones 29 y 36, (6-7) gen *flaA* amplificado con los oligonucleótidos del vector T7 usando como molde el DNA plasmídico de los clones 6 y 12, (8-9) gen *flaA* amplificado con los oligonucleótidos del gen usando como molde el DNA plasmídico de los clones 6 y 12. Las flechas rojas señalan los genes *flaA* e *ialB* amplificados con los iniciadores del vector T7, y las flechas negras indican los genes *flaA* e *ialB* amplificados con los oligonucleótidos de cada gen.

#### 4.9. Secuenciación de los genes *ialB* y *flaA*

Los genes *ialB* y *flaA* de *B. bacilliformis* clonados fueron secuenciados a través de una reacción de PCR con el kit BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) usando como molde los plásmidos pET101-*ialB* y pET101-*flaA* de los clones seleccionados con el inserto en marco de lectura (1, 9, 19, 29 y 36 de *ialB* y 1, 2, 4, 5, 6, 11 y 12 de *flaA*) que fueron obtenidos con el kit QIAprep<sup>®</sup> Miniprep (QUIAGEN). También se secuenció el producto PCR obtenido al usar los oligonucleótidos del gen *ialB* de *B. bacilliformis* con el DNA genómico de la cepa *B. clarridgeiae*, para esto previamente el amplificado fue purificado con el kit Purelink<sup>™</sup> PCR Purification (Invitrogen), y luego fue empleado como molde para la reacción de PCR que después se envió a secuenciar. En la secuenciación se utilizó el método indicado por Sanger et al. (1977) y Murray (1989), utilizando 5.8 µL de los plásmidos pET101-*ialB* y pET101-*flaA* en reacciones independientes.

Para secuenciar el amplicón de la cepa *B. clarridgeiae* se utilizó como molde 5.7 µL del amplicón purificado con 0.3 µL de oligonucleótido. Se hizo sólo una reacción utilizando el oligonucleótido directo (5'-CACC ATG AAA AAA ATA TTA AAT TTA TTT G-3') del gen *ialB*, es decir el gen fue secuenciado en una sola dirección.

Con respecto a los secuenciamientos de los genes *ialB* y *flaA* de *B. bacilliformis*, que fueron clonados en la reacción se usó de oligonucleótido el directo del vector T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') para secuenciar el gen *ialB*, pero para el gen *flaA* se utilizó ambos oligonucleótidos, el directo y reverso (5'-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3') del vector T7, en dos reacciones separadas para secuenciamientos por ambos lados debido al tamaño del amplicón. La temperatura de hibridación en el PCR de secuenciamiento de los genes *ialB* y *flaA* fue 58°C por ser la T<sub>m</sub> de los oligonucleótidos del gen *ialB* y vector T7 utilizados.

Las secuencias nucleotídicas resultantes luego de pasar las muestras por el secuenciador, de los genes *ialB* y *flaA* de *B. bacilliformis* y del amplicón obtenido a partir de *B. clarridgeiae*, fueron editadas manualmente utilizando el programa editor de alineamiento de secuencias Bioedit (Hall, 1999). Luego se copiaron e introdujeron todas las secuencias editadas en formato FASTA en el programa de alineamiento

local BLAST del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y se hicieron los respectivos alineamientos de manera independiente, comparando dichas secuencias con las disponibles en la base de datos de nucleótidos para los genes *ialB* y *flaA* en el GenBank del NCBI, empleando los algoritmos blastn y megablast, a partir de lo cual se obtuvo los porcentajes de identidad (Figuras 32-34).

Debido a que el gen *flaA* se secuenció en ambas direcciones con el oligonucleótido directo y el reverso del vector T7, entonces se buscó la secuencia consenso utilizando el programa CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>). Como todos los clones que contenían los plásmidos pET101-*ialB* y pET101-*flaA* con el gen en marco de lectura fueron secuenciados, por consiguiente se obtuvo varias secuencias nucleotídicas, las cuales al ser alineadas con el algoritmo megablast en el BLAST daban porcentajes de identidad muy similares que fluctuaban entre 97 a 99%. Se seleccionó la secuencia en mejores condiciones y se hicieron los alineamientos múltiples empleando la matriz de similaridad BLOSUM62 y el programa ClustalW (Thompson et al., 1994). Luego los alineamientos obtenidos para el gen *ialB* y *flaA* de *B. bacilliformis* CIP 57.18, fueron editados con Bioedit o Boxshade ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)) (Figura 32 - 34).

Según los alineamientos de las secuencias nucleotídicas del gen *ialB* de *B. bacilliformis* (Figura 32), se obtuvo un porcentaje de índice de identidad de 99% con el gen de la proteína asociada a la invasión IalB incluido en el genoma completo de la cepa *B. bacilliformis* KC583 (Nº de acceso CP000524). Para el gen *flaA* de *B. bacilliformis* (Figura 33), el índice de identidad fue de 99% con el gen de la flagelina (Nº de acceso L20677) también incluido dentro del genoma completo de la cepa *B. bacilliformis* KC583.



<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	1	ATGAAAAAA	TATTAAATTT	ATTTGTAATT	TCTGCTTTCT	TGAA-AGTTC	49
<i>B. bacilliformis</i> KC583	1	ATGAAAAAA	TATTAAATTT	ATTTGTAATT	TCTGCTTTCT	TGAGTATTTT	50
Clustal Consensus	1	*****	*****	*****	*****	*** * *	47
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	50	CTCTGCAGCG	TTTGCTCAAA	ATGTAAAACC	AGCTGCAACG	AAGCCTTCTG	99
<i>B. bacilliformis</i> KC583	51	CTCTGCAGCG	TTTGCTCAAA	ATGTAAAACC	AGCTGCAACG	AAGCCTTCTG	100
Clustal Consensus	48	*****	*****	*****	*****	*****	97
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	100	TTGCTACACT	GCCGAATGGT	GCTTCTTCAT	TAACTGAGAC	TTACGGTTTG	149
<i>B. bacilliformis</i> KC583	101	TTGCTACACT	GCCGAATGGT	GCTTCTTCAT	TAACTGAGAC	TTACGGTTTG	150
Clustal Consensus	98	*****	*****	*****	*****	*****	147
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	150	TGGAGCGTTA	ACTGTGGTAT	ACAGGATGGG	AACAAAATTT	GTATTATGCT	199
<i>B. bacilliformis</i> KC583	151	TGGAGCGTTA	ACTGTGGTAT	ACAGGATGGG	AACAAAATTT	GTATTATGCT	200
Clustal Consensus	148	*****	*****	*****	*****	*****	197
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	200	TCGTGAGGAA	GTTAATGAGC	AAGATCGTGT	TCTATTGTCT	ATGAGTGTTT	249
<i>B. bacilliformis</i> KC583	201	TCGTGAGGAA	GTTAATGAGC	AAGATCGTGT	TCTATTGTCT	ATGAGTGTTT	250
Clustal Consensus	198	*****	*****	*****	*****	*****	247
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	250	CTCTTGATGG	GGAAGGTACT	GTATCTGGCA	ATTTGACGAT	TCCTTTTGGT	299
<i>B. bacilliformis</i> KC583	251	CTCTTGATGG	GGAAGGTACT	GTATCTGGCA	ATTTGACGAT	TCCTTTTGGT	300
Clustal Consensus	248	*****	*****	*****	*****	*****	297
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	300	ATATTGGTTT	CTAAGCCTAT	TCGTTTGCAT	GTAGATGATT	CGAAATCTGT	349
<i>B. bacilliformis</i> KC583	301	ATATTGGTTT	CTAAGCCTAT	TCGTTTGCAT	GTAGATGATT	CGAAATCTGT	350
Clustal Consensus	298	*****	*****	*****	*****	*****	347
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	350	TATTGAAAGC	AATGTTTCGCA	CTTGTGTGCC	AGCAGGCTGC	GTGGTTCCAA	399
<i>B. bacilliformis</i> KC583	351	TATTGAAAGC	AATGTTTCGCA	CTTGTGTGCC	AGCAGGTTGT	GTGGTTCCAA	400
Clustal Consensus	348	*****	*****	*****	*****	*****	395
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	400	TAGTTTTTGA	CAAAAATTTT	GTAGGGTCTT	TACGCGCTGG	CAAGCAGTTG	449
<i>B. bacilliformis</i> KC583	401	TAGTTTTTGA	CAAAAATTTT	GTAGGGTCTT	TACGCGCTGG	CAAGCAGTTG	450
Clustal Consensus	396	*****	*****	*****	*****	*****	445
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	450	AAATTATCTA	TGACAGTTGC	TGCTCCAGGT	GAACCAACCT	TGGATAAATTT	499
<i>B. bacilliformis</i> KC583	451	AAATTATCTA	TGACAGTTGC	TGCTCCAGGT	GAACCAACCT	TGGATAAATTT	500
Clustal Consensus	446	*****	*****	*****	*****	*****	495
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	500	ATTTGTGCAA	TGGATGGTT	TCAGCAACGC	TCTTAAGCGT	TTAACTTCTT	549
<i>B. bacilliformis</i> KC583	501	ATTTGTGCAA	TGGATGGTT	TCAGCAACGC	TCTTAAGCGT	TTAACTTCTT	550
Clustal Consensus	496	*****	*****	*****	*****	*****	545
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	550	TGCAAAAAAA	G	560			
<i>B. bacilliformis</i> KC583	551	TGCAAAAAA	A	561			
Clustal Consensus	546	*****	*	554			

**Figura 32.-** Alineamiento del gen *ialB* de las cepas *B. bacilliformis* CIP 57.18 (clon 36) y *B. bacilliformis* KC583, usando CLUSTALW y Bioedit.

<i>B. bacilliformis</i> KC583	1	ATGGGTTCTA	GTATATTAAC	TAATAGATCT	GCAATGACTG	CATTGCAGAC	50
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	1	ATGGGTTCTA	GTATATTAAC	TAATAGATCT	GCAATGACTG	CA--GCAGAC	48
Clustal Consensus	1	*****	*****	*****	*****	** *****	48
<i>B. bacilliformis</i> KC583	51	ACTCCGTAAC	ATTGATAACA	ACTTAGATAA	ATCAAAAGAC	CGTATTTCAA	100
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	49	ACTCCGTAAC	ATTGATAACA	ACTTAGATAA	ATCAAAAGAC	CGTATTTCAA	98
Clustal Consensus	49	*****	*****	*****	*****	*****	98
<i>B. bacilliformis</i> KC583	101	CAGGTTTGGC	TATTGGAAGT	GCTTCTGACA	ATACTGCTTA	TTGGTCTATT	150
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	99	CAGGTTTGGC	TATTGGAAGT	GCTTCTGACA	ATACTGCTTA	TTGGTCTATT	148
Clustal Consensus	99	*****	*****	*****	*****	*****	148
<i>B. bacilliformis</i> KC583	151	TCATCAATGA	TGAAGCATGA	CAGTAACACA	ATGAGCGCTG	TTGTTGATGC	200
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	149	TCATCAATGA	TGAAGCATGA	CAGTAACACA	ATGAGCGCTG	TTGTTGATGC	198
Clustal Consensus	149	*****	*****	*****	*****	*****	198
<i>B. bacilliformis</i> KC583	201	TATTAATTTG	GGTAGAGAAC	AGGTAAACGT	TGCTGCAACA	GCTGTTAATT	250
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	199	TATTAATTTG	GGTAGAGAAC	AGGTAAACGT	TGCTGCAACA	GCTGTTAATT	248
Clustal Consensus	199	*****	*****	*****	*****	*****	248
<i>B. bacilliformis</i> KC583	251	TAACCAAAGA	ATCTCTTGAT	GATATCCAAA	AATCAATGGT	TTCCGCGCGT	300
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	249	TAACCAAAGA	ATCTCTTGAT	GATATCCAAA	AATCAATGGT	TTCCGCGCGT	298
Clustal Consensus	249	*****	*****	*****	*****	*****	298
<i>B. bacilliformis</i> KC583	301	GAAAAATCTG	ATGATGATAT	CATGAAGATT	CAGGACTCCA	TCAAGGGAAA	350
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	299	GAAAAATCTG	ATGATGATAT	CATGAAGATT	CAGGACTCCA	TCAAGGGAAA	348
Clustal Consensus	299	*****	*****	*****	*****	*****	348
<i>B. bacilliformis</i> KC583	351	TATGCAAAAT	ATTTCTAACG	CAATCCAATC	TGCTGCTTTT	GGTGGAAAAA	400
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	349	TATGCAAAAT	ATTTCTAACG	CAATCCAATC	TGCTGCTTTT	GGTGGAAAAA	398
Clustal Consensus	349	*****	*****	*****	*****	*****	398
<i>B. bacilliformis</i> KC583	401	ATATCCTTTC	CAATGGTGGT	GAAAAAGTTG	GTATTGCTGC	TGGTTACCGT	450
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	399	ATATCCTTTC	CAATGGTGGT	GAAAAAGTTG	GTATTGCTGC	TGGTTACCGT	448
Clustal Consensus	399	*****	*****	*****	*****	*****	448
<i>B. bacilliformis</i> KC583	451	CGTGAAGGCT	CCGCTGTTTA	TGTGGATATG	ATTGAAGTTG	GTGGTGCAGA	500
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	449	CGTGAAGGCT	CCGCTGTTTA	TGTGGATATG	ATTGAAGTTG	GTGGTGCAGA	498
Clustal Consensus	449	*****	*****	*****	*****	*****	498
<i>B. bacilliformis</i> KC583	501	ATTAAACTTT	GGTGTATATG	GGCCTGATGG	TACCATTGAT	ATGACTCAAG	550
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	499	ATTAAACTTT	GGTGTATATG	GGCCTGATGG	TACCATTGAT	ATGACTCAAG	548
Clustal Consensus	499	*****	*****	*****	*****	*****	548
<i>B. bacilliformis</i> KC583	551	GTATTTTAAA	GGGTGTCTTT	GGCAAGAGTG	ATAAGGATAT	TGATGCAGGT	600
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	549	GTATTTTAAA	GGGTGTCTTT	GGCAAGAGTG	ATAAGGATAT	TGATGCAGGT	598
Clustal Consensus	549	*****	*****	*****	*****	*****	598
<i>B. bacilliformis</i> KC583	601	ATCAAAACCT	TCACCTGAAGC	TGCTGATAAA	CAAAAAGGTT	TAGAAGATGC	650
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	599	ATCAAAACCT	TCACCTGAAGC	TGCTGATAAA	CAAAAAGGTT	TAGAAGATGC	648
Clustal Consensus	599	*****	*****	*****	*****	*****	648
<i>B. bacilliformis</i> KC583	651	TCTTGCTAAG	GCAGAGGCTG	CTGTTGCCGC	TAATCCTAAT	GATGAAGCAG	700
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	649	TCTTGCTAAG	GCAGAAGCTG	CTGTTGCTGC	TAATCCTAAT	GATGAAGCAG	698
Clustal Consensus	649	*****	*****	*****	*****	*****	696
<i>B. bacilliformis</i> KC583	701	CAAAAACAGC	ATTAGAGGAA	GCTAAAAAAG	CTGTAGAAGA	CAATAAAGAA	750
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	699	CAAAAACAGC	ATTAGAGGAA	GCTAAAAAAG	CTGTAGAAGA	CAATAAAGAA	748
Clustal Consensus	697	*****	*****	*****	*****	*****	746
<i>B. bacilliformis</i> KC583	751	GATTGGACCA	AGGCACAAAG	TGATTTTAAA	GTTGTGCTG	ATAGCATGAC	800
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	749	GATTGGACCA	AGGCACAAAG	TGATTTTAAA	GTTGTGCTG	ATAGCATGAC	798
Clustal Consensus	747	*****	*****	*****	*****	*****	796
<i>B. bacilliformis</i> KC583	801	TTTGAATGAC	TTTGTTTACA	TGCAAGGTGT	TGGTGGTCTG	CCTTCAGTTG	850
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	799	TTTGAATGAC	TTTGTTTACA	TGCAAGGTGT	TGGTGGTCTG	CCTTCAGTTG	848
Clustal Consensus	797	*****	*****	*****	*****	*****	846

<i>B. bacilliformis</i> KC583	851	CGCAAAGTAT	AATTCTGAAC	AGTGTTCAAA	AGACAGTGCG	TCATGCTGTT	900
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	849	CGCAAAGTAA	AATTCTGAAC	AGTGTTCAAA	AGACAGTGCG	TCATGCTGTT	898
Clustal Consensus	847	*****	*****	*****	*****	*****	895
<i>B. bacilliformis</i> KC583	901	GATGTAACAC	TTACTGCAGG	GTCTAAAATT	GGATCTGCTG	TCAATCAGGT	950
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	899	GATGTAACAC	TTACTGCAGG	GTCTAAAATT	GGATCTGCTG	TCAATCAGGT	948
Clustal Consensus	896	*****	*****	*****	*****	*****	945
<i>B. bacilliformis</i> KC583	951	GGACAGCCAA	TTGAACTTTG	TTAAAAGATT	GTTAGACAAT	ATTGAAGCAG	1000
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	949	GGACAGCCAA	TTGAACTTTG	TTAAAAGATT	GTTAGACAAT	ATTGAAGCAG	998
Clustal Consensus	946	*****	*****	*****	*****	*****	995
<i>B. bacilliformis</i> KC583	1001	GTATTGGTGC	ACTTGTGTAT	GCTGATATGA	ATGCAGAATC	TGCAAAATTG	1050
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	999	GTATTGGTGC	ACTTGTGTAT	GCTGATATGA	ATGCAGAATC	TGCAAAATTG	1048
Clustal Consensus	996	*****	*****	*****	*****	*****	1045
<i>B. bacilliformis</i> KC583	1051	TCAGCTTTGC	AAGTTCAACA	GCAGCTCGGT	ATTCCCAGGC	TCTTTCTATT	1100
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	1049	TCAGCTTTGC	AAGTTCAACA	GCAGCTCGGT	ATT--CAGGC	TCTTTCTATT	1096
Clustal Consensus	1046	*****	*****	*****	***	*****	1093
<i>B. bacilliformis</i> KC583	1101	GCAAAATCAGG	GCAGCCAGAA	TATTTTAG-	1128		
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	1097	GCAAAATCAGG	GCAGCCAGAA	TATTTTAGG	1125		
Clustal Consensus	1094	*****	*****	*****	1121		

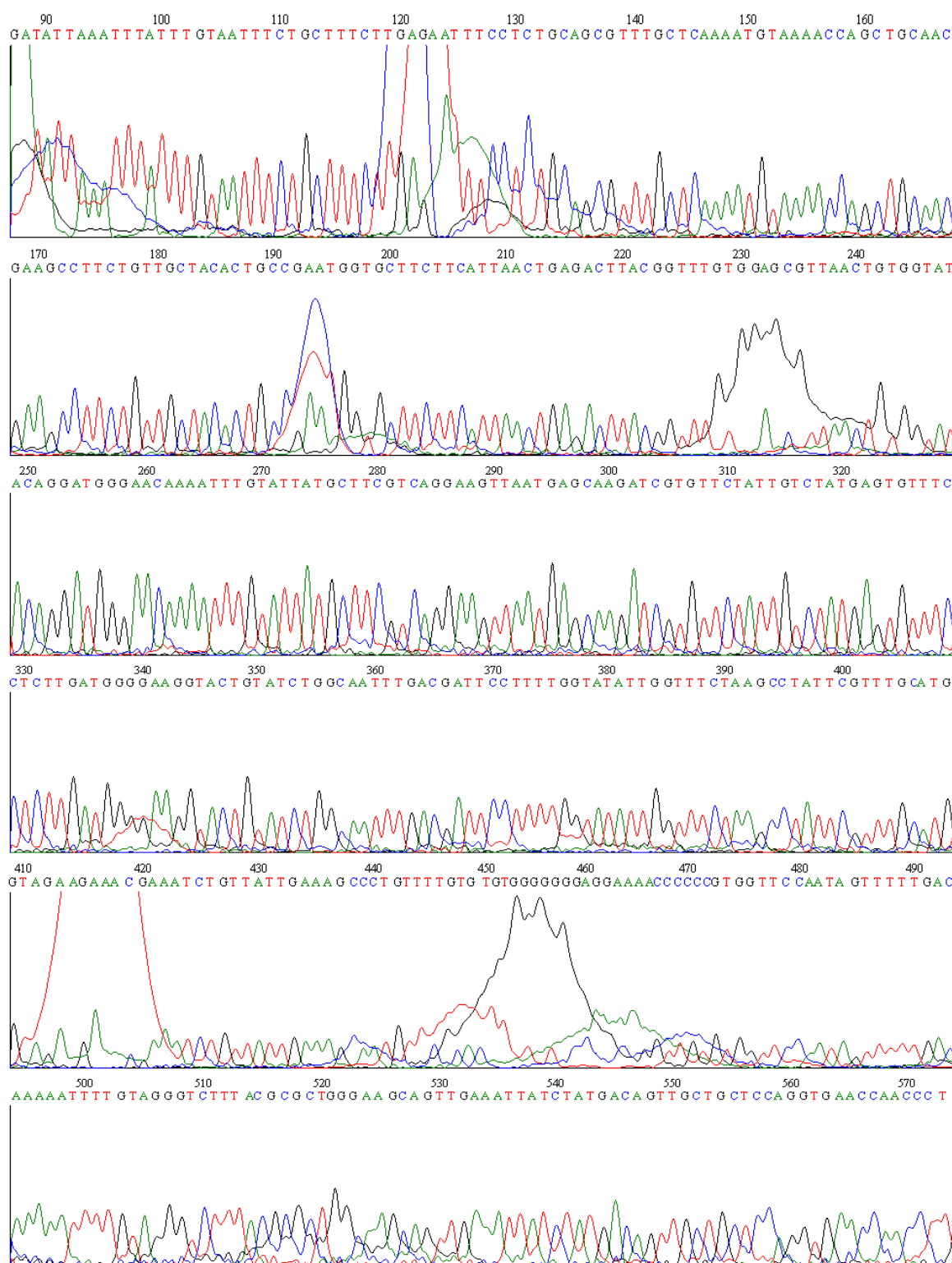
**Figura 33.-** Alineamiento del gen *flaA* de las cepas *B. bacilliformis* CIP 57.18 (clon 6) y *B. bacilliformis* KC583, usando CLUSTALW y Bioedit.

En el caso del amplicón de *B. clarridgeiae* CIP 104772, se procedió de la misma manera descrita para el producto PCR del gen *ialB*, consiguiendo un índice de identidad de 96% (Figura 34) luego de alinearlo con el genoma completo de la cepa *B. bacilliformis* KC583 y con el gen de la proteína asociada a la invasión *ialB*, lo que podría indicar que esta cepa también presenta un gen *ialB* con lo cual el uso de este gen como específico y único de la especie *B. bacilliformis* quedaría totalmente descartado.

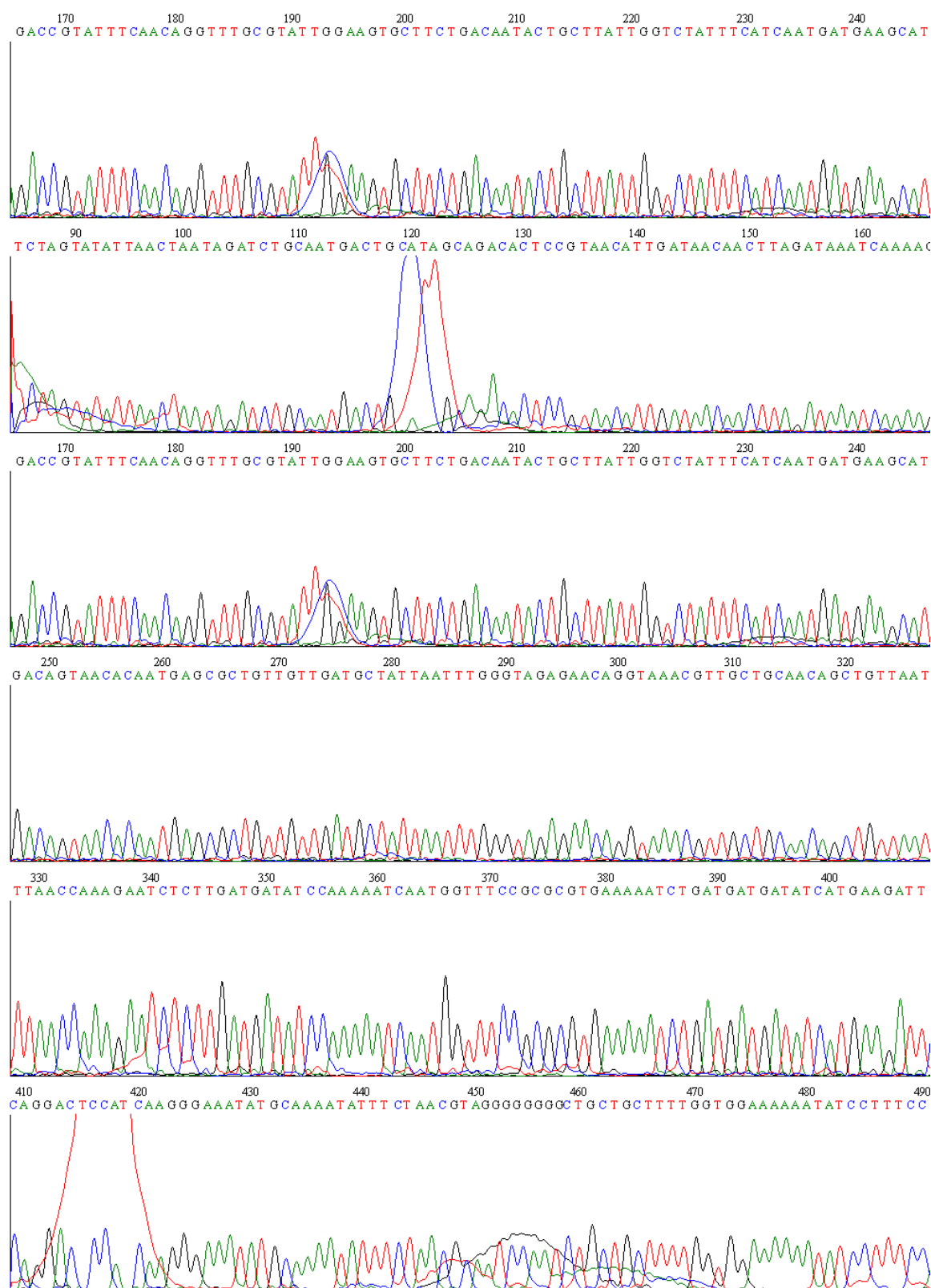
<i>B. clarridgeiae</i> CIP 104772	1	-----	---TAATTTT	GTGGAACATT	TCTGCTTGCA	ACAGTCTAAT	37
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	1	ATGAAAAAA	TATTAAATTT	ATTTGTAATT	TCTGCTTTCT	TGAA-AGTTC	49
<i>B. bacilliformis</i> KC583	1	ATGAAAAAA	TATTAAATTT	ATTTGTAATT	TCTGCTTTCT	TGAGTATTTT	50
Clustal Consensus	1		*** **	*	*** ***** *	*	19
<i>B. clarridgeiae</i> CIP 104772	38	TTCTCCAGTA	TATGATCCAA	GTTTAAATCC	ACCGGAGATG	AATCTTTTCGG	87
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	50	CTCTGCAGCG	TTTGCTCAAA	ATGTAAAACC	AGCTGCAACG	AAGCCTTCTG	99
<i>B. bacilliformis</i> KC583	51	CTCTGCAGCG	TTTGCTCAAA	ATGTAAAACC	AGCTGCAACG	AAGCCTTCTG	100
Clustal Consensus	19	*** **	* ** * *	* ** *	* * * * *	* * * * *	51
<i>B. clarridgeiae</i> CIP 104772	88	TTACTGCACC	TCCTTGTAGG	GCTTCTTCAT	TAACTGAGAA	TTACGGTTTG	137
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	100	TTGCTACACT	GCCGAATGGT	GCTTCTTCAT	TAACTGAGAC	TTACGGTTTG	149
<i>B. bacilliformis</i> KC583	101	TTGCTACACT	GCCGAATGGT	GCTTCTTCAT	TAACTGAGAC	TTACGGTTTG	150
Clustal Consensus	52	** * * *	** * *	*****	*****	*****	91
<i>B. clarridgeiae</i> CIP 104772	138	TGGAGCGTAA	ACTGTGGTAT	ACAGGATGGG	AACAAAATTT	GTATTATGCT	187
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	150	TGGAGCGTTA	ACTGTGGTAT	ACAGGATGGG	AACAAAATTT	GTATTATGCT	199
<i>B. bacilliformis</i> KC583	151	TGGAGCGTTA	ACTGTGGTAT	ACAGGATGGG	AACAAAATTT	GTATTATGCT	200
Clustal Consensus	92	***** *	*****	*****	*****	*****	140
<i>B. clarridgeiae</i> CIP 104772	188	TCGTCCGGAA	GTTAATGAGC	AAGATCGTGT	TCTATTGTCT	ATGAGTGTTT	237
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	200	TCGTCCGGAA	GTTAATGAGC	AAGATCGTGT	TCTATTGTCT	ATGAGTGTTT	249
<i>B. bacilliformis</i> KC583	201	TCGTCCGGAA	GTTAATGAGC	AAGATCGTGT	TCTATTGTCT	ATGAGTGTTT	250
Clustal Consensus	141	***** **	*****	*****	*****	*****	189
<i>B. clarridgeiae</i> CIP 104772	238	CTCTTGATGG	GGAAGGTACT	GTATCTGGCA	ATTTGACGAT	TCCTTTTGGT	287
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	250	CTCTTGATGG	GGAAGGTACT	GTATCTGGCA	ATTTGACGAT	TCCTTTTGGT	299
<i>B. bacilliformis</i> KC583	251	CTCTTGATGG	GGAAGGTACT	GTATCTGGCA	ATTTGACGAT	TCCTTTTGGT	300
Clustal Consensus	190	*****	*****	*****	*****	*****	239
<i>B. clarridgeiae</i> CIP 104772	288	ATATTGGTTT	CTAAGCCTAT	TCGTTTGCAT	GTAGATGATT	CGAAATCTGT	337
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	300	ATATTGGTTT	CTAAGCCTAT	TCGTTTGCAT	GTAGATGATT	CGAAATCTGT	349
<i>B. bacilliformis</i> KC583	301	ATATTGGTTT	CTAAGCCTAT	TCGTTTGCAT	GTAGATGATT	CGAAATCTGT	350
Clustal Consensus	240	*****	*****	*****	*****	*****	289
<i>B. clarridgeiae</i> CIP 104772	338	TATTGAAAGC	AATGTTTCGCA	CTTGTGTGCC	AGCAGGTTGT	GTGGTTCCCA	387
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	350	TATTGAAAGC	AATGTTTCGCA	CTTGTGTGCC	AGCAGGCTGC	GTGGTTCC-A	398
<i>B. bacilliformis</i> KC583	351	TATTGAAAGC	AATGTTTCGCA	CTTGTGTGCC	AGCAGGTTGT	GTGGTTCC-A	399
Clustal Consensus	290	*****	*****	*****	***** *	***** *	336
<i>B. clarridgeiae</i> CIP 104772	388	ATAGTTTTTG	ACAAAAATTT	TGTAGGTGTC	TATTACGC-C	TGGCAAGCAG	436
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	399	ATAGTTTTTG	ACAAAAATTT	TGTAGG-GTC	T-TTACGCGC	TGGCAAGCAG	446
<i>B. bacilliformis</i> KC583	400	ATAGTTTTTG	ACAAAAATTT	TGTAGG-GTC	T-TTACGCGC	TGGCAAGCAG	447
Clustal Consensus	337	*****	*****	***** **	* ***** *	*****	383
<i>B. clarridgeiae</i> CIP 104772	437	ATGAAATTAT	CTATGAGGGT	TGCGGTTCCTA	CCAGGTTGAG	CCACCGCTGA	486
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	447	TTGAAATTAT	CTATGACAGT	TGCTGCTCCA	GGTGAACCAA	CCTTGGATAA	496
<i>B. bacilliformis</i> KC583	448	TTGAAATTAT	CTATGACAGT	TGCTGCTCCA	GGTGAACCAA	CCTTGGATAA	497
Clustal Consensus	383	*****	***** *	*** * **	* *	** * * *	415
<i>B. clarridgeiae</i> CIP 104772	487	TTTGTTTATG	CTCCAGGAAG	CTTAAATCAG	CACTCATTTT	AATATTTTTT	536
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	497	TTTATTTTGTG	CAATTGGATG	GTTTCAGCAA	CGCTC--TTA	AGCGTTTAAC	544
<i>B. bacilliformis</i> KC583	498	TTTATTTTGTG	CAATTGGATG	GTTTCAGCAA	CGCTC--TTA	AGCGTTTAAC	545
Clustal Consensus	416	** * * *	* * * *	* * * *	* * * *	* * * *	443
<i>B. clarridgeiae</i> CIP 104772	537	ACCTCGGTAA	AAAAA-----	-----	-----	-----	551
<i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18	545	TTCTTTTCGAA	AAAAAGGGCG	AGCTCAATTC	GAAGCTTGAA	GGTAAGCCTA	594
<i>B. bacilliformis</i> KC583	546	TTCTTTTCGAA	AAATAA-----	-----	-----	-----	561
Clustal Consensus	443	** * * *	** * *				452

**Figura 34.-** Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas del gen *ialB* de las cepas *B. clarridgeiae* CIP 104772, *B. bacilliformis* CIP 57.18 y *B. bacilliformis* KC583, usando CLUSTALW y Bioedit. El producto PCR de *B. clarridgeiae* CIP 104772, obtenido empleando los oligonucleótidos del gen *ialB* de *B. bacilliformis*, fue secuenciado con el oligonucleótido directo del mismo gen.

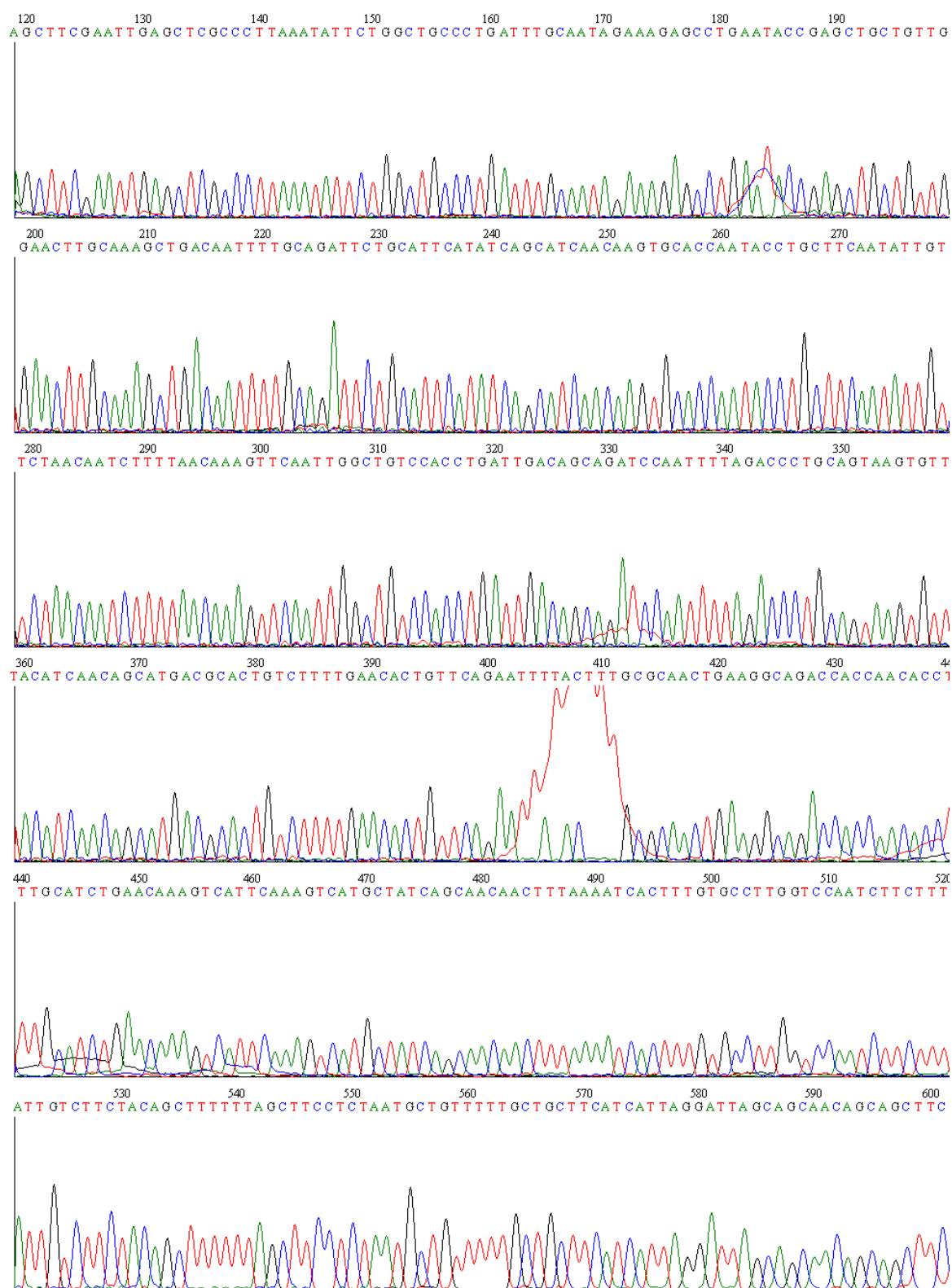
A partir de las secuencias nucleotídicas editadas se elaboraron los respectivos cromatogramas para el gen *ialB* (Figura 35) y *flaA* (Figuras 36 y 37) de *B. bacilliformis*.



**Figura 35.-** Cromatograma del gen *ialB* de *Bartonella bacilliformis* CIP 57.18 (oligonucleótido directo)



**Figura 36.-** Parte del cromatograma del gen *flaA* de *B. bacilliformis* CIP 57.18 (oligonucleótido directo).



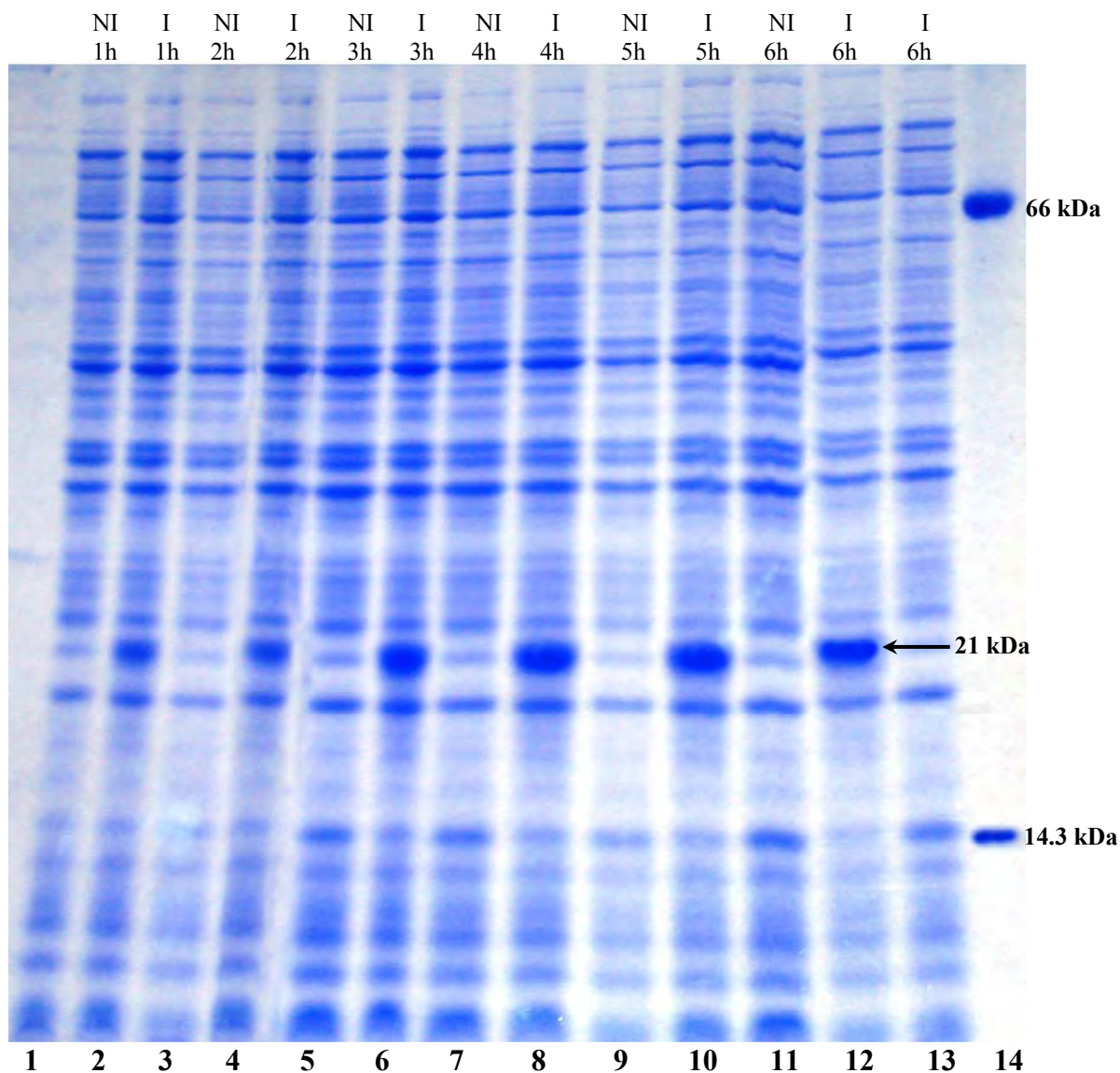
**Figura 37.-** Parte del cromatograma del gen *flaA* de *B. bacilliformis* CIP 57.18 (oligonucleótido reverso)

#### **4.10. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes IalB y FlaA en *Escherichia coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3)**

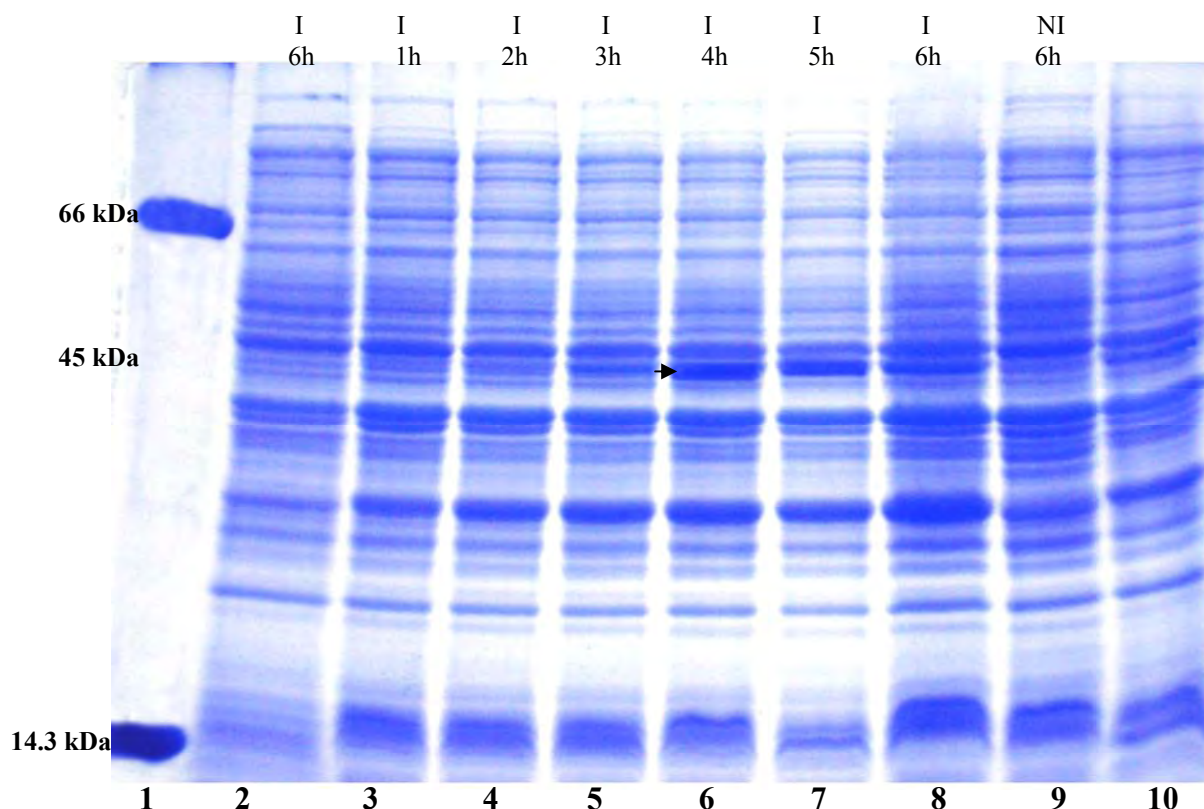
Una vez confirmadas las secuencias de los genes *ialB* y *flaA* de *B. bacilliformis*, se usó 5 µL de los plásmidos del clon 29 (pET101-*ialB*) y del clon 12 (pET101-*flaA*), para transformar de forma independiente 50 µL de células competentes de la cepa *Escherichia coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3), la cual tenía inserto en su genoma el gen que codifica la RNA polimerasa del fago T7 y es inducible por IPTG. A partir de esta cepa se hicieron los ensayos de expresión de las proteínas recombinantes.

La curva de inducción de expresión de las proteínas recombinantes, se realizó con el fin de poder determinar el tiempo de máxima inducción y así evitar la formación de cuerpos de inclusión que dificultan la recuperación y purificación de la proteína de interés. Las electroforesis PAGE-SDS evidenciaron que a las 4 y 5 horas de inducción con IPTG, en agitación constante a 37°C se obtenía la máxima sobre expresión de las proteínas recombinantes IalB (Figura 38) y FlaA (Figura 39). En los geles también se corrieron muestras de sedimento celular de la cepa *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) sin ningún inserto inducido con IPTG 1 mM y las muestras incubadas sin IPTG, todo como controles negativos. En ninguno de estos controles negativos se evidencia la banda inducida que correspondía a la proteína recombinante IalB o FlaA. Por lo tanto, los genes insertados en el vector plasmídico son sólo expresados en forma inducible.





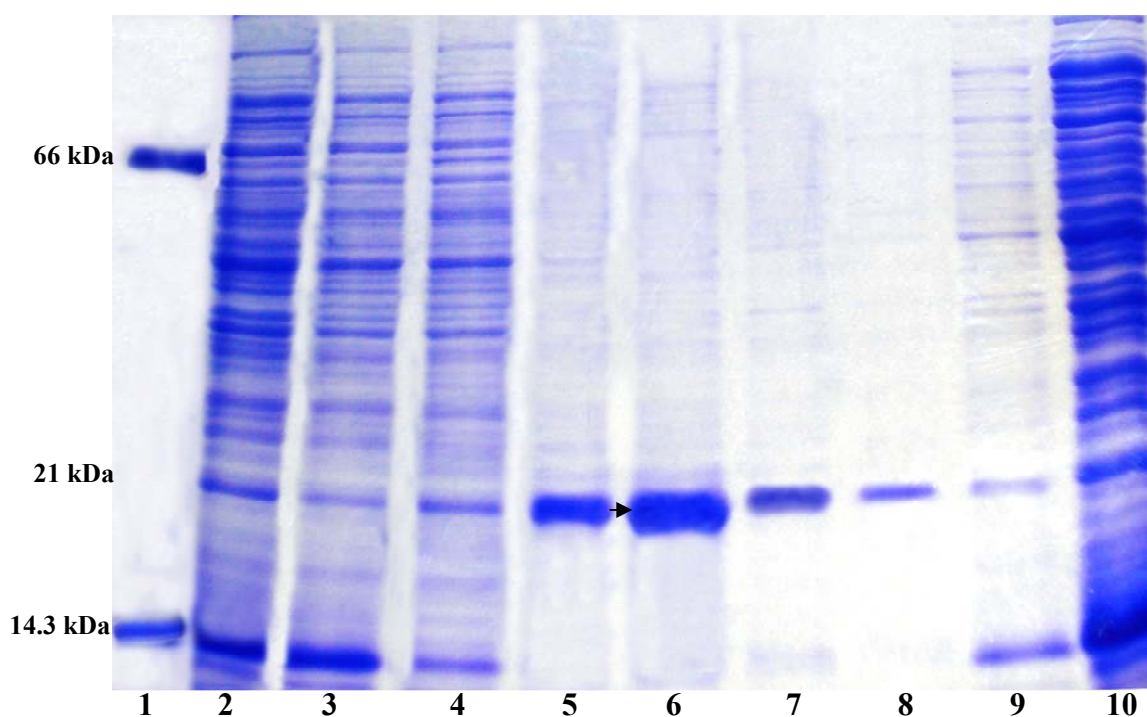
**Figura 38.-** PAGE-SDS de la cinética de inducción de la proteína recombinante IalB en *E. coli* BL21 Star (DE3), realizado en un gel resolutivo al 12% y un gel concentrador al 5%. Cultivo del clon 29 inducido con IPTG 1 mM e incubado en agitación a 37°C por 6 horas. (I) Cultivos celulares inducidos, (NI) cultivos celulares no inducidos. (13) *E. coli* BL21 Star (DE3) sin ningún inserto. (14) Marcador de peso molecular (seroalbúmina bovina y lisozima). Se observa que entre las 4 a 5 horas de incubación se alcanza la máxima expresión de la proteína recombinante IalB cuyo peso calculado corresponde a 21 kDa. La flecha señala la proteína IalB de 21 kDa, inducida con IPTG durante 6 horas.



**Figura 39.-** PAGE-SDS de la cinética de inducción de la proteína recombinante FlaA en *E. coli* BL21 Star (DE3), realizado en un gel resolutor al 12% y un gel concentrador al 5%. Cultivo del clon 12 inducido con IPTG 1 mM e incubado en agitación a 37°C por 6 horas. (1) Marcador de peso molecular (seroalbúmina bovina y lisozima). (2) *E. coli* BL21 Star (DE3) sin ningún inserto. (10) sedimento celular del clon 12 que quedó luego de sonicar el cultivo. (I) Cultivos celulares inducidos, (NI) cultivos celulares no inducidos. Se observa que entre las 4 a 5 horas de incubación se alcanza la máxima expresión de la proteína recombinante FlaA cuyo peso calculado corresponde a 45 kDa. La flecha señala la proteína FlaA de 45 kDa, inducida con IPTG durante 4 horas.

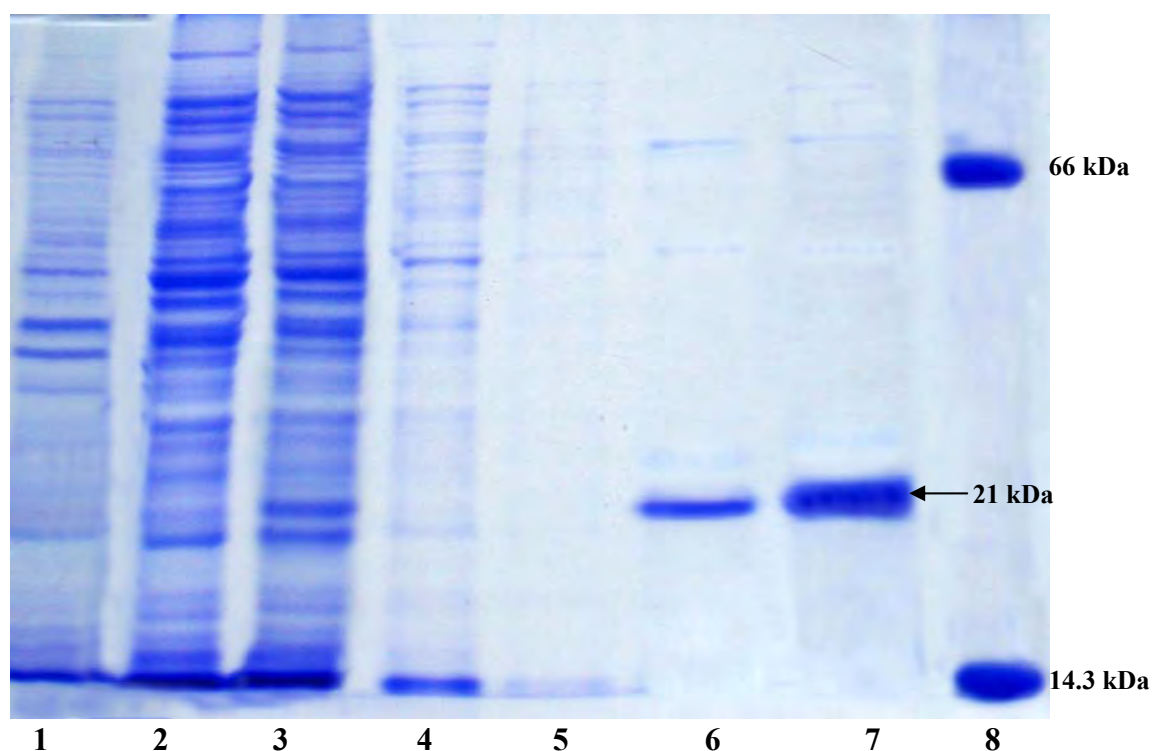
Una vez determinado que entre las 4 a 5 horas de inducción con IPTG 1 mM se obtenía la máxima expresión de las proteínas recombinantes, entonces se procedió al cultivo en gran escala (cultivos de 300 mL de LB con ampicilina a una concentración de 100 µg/mL de medio) de los clones seleccionados 29 (pET101-*ialB*) y 12 (pET101-*flaA*), para a partir de ellos inducir la expresión de las proteínas IalB y FlaA en gran escala y que luego faciliten purificar la mayor cantidad posible de proteína recombinante. En todos estos casos, las proteínas recombinantes presentes en el sedimento celular obtenido fueron purificadas usando resina o matriz de agarosa-Niquel.

Se ensayó un primer protocolo de purificación con la proteína recombinante IalB, para lo cual el sedimento celular obtenido luego de centrifugar los 300 mL de cultivo inducido, fue sonificado sólo 6 veces por 10 segundos cada vez, y el lisado recuperado fue incubado por 30 minutos con 250  $\mu$ L de resina pre-equilibrada (agarosa-niquel). Para la colecta de la primera y segunda elución se hicieron incubaciones de 30 y 15 minutos respectivamente. Sin embargo, debido a que en cada paso de la purificación se iba perdiendo proteína recombinante según se observó en el PAGE-SDS (Figura 40), se hicieron modificaciones (ver apartado 3.13), las cuales permitieron estandarizar la técnica que en adelante fue la que se empleó, para purificar y recuperar la máxima cantidad de proteína recombinante.



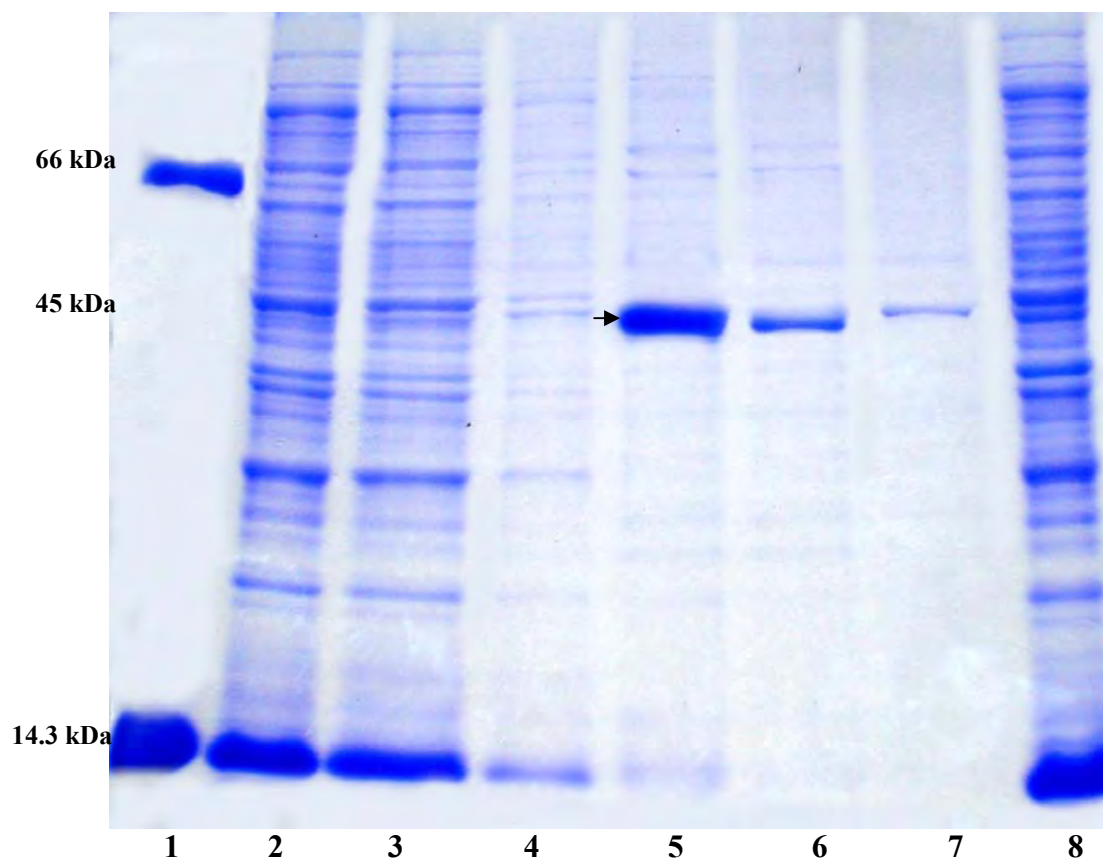
**Figura 40.-** PAGE-SDS en un gel resolutivo al 12% y un gel concentrador al 5%, de las colectas de la purificación por cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (bajo condiciones nativas) de la proteína recombinante IalB del clon 29 de la cepa recombinante *E. coli* BL21 Star<sup>™</sup> (DE3). (1) Marcador de peso molecular (seroalbúmina bovina y lisozima), (2) sobrenadante no unido a la resina agarosa-Niquel, (3) sobrenadante del primer lavado, (4) sobrenadante del segundo lavado, (5) segundo eluido, (6) primer eluido. (7-10) A partir del sedimento que quedó, se realizó un segundo proceso de purificación bajo las mismas condiciones. (7) primer eluido, (8) segundo eluido, (9) sobrenadante del primer lavado, (10) sedimento que fue reutilizado. Se observa a la proteína IalB purificada con un peso molecular aproximado de 21kDa. La flecha señala la proteína IalB de 21 kDa colectada en el primer eluido.

Utilizando el protocolo estandarizado es que se redujo al mínimo las pérdidas de las proteínas recombinantes durante el proceso de purificación, recuperando puras la proteína IalB del clon 29 (Figura 41) y la proteína FlaA del clon 12 (Figura 42). Los pesos moleculares aparentes para IalB y FlaA fueron de 21 kDa y 45 kDa, respectivamente. Restando los 3 kDa en que incrementan su peso, y esto debido al tag de 6 histidinas que se les adicionó en el C-terminal durante la clonación, los pesos moleculares de ambas proteínas recombinantes se corresponden con sus secuencias de 558 pb (*ialB*) y 1128 pb (*flaA*) que codifican proteínas de 18 kDa y 42 kDa para IalB y FlaA respectivamente (Scherer et al., 1993; Mitchell y Minnick, 1995; Coleman y Minnick, 2001).



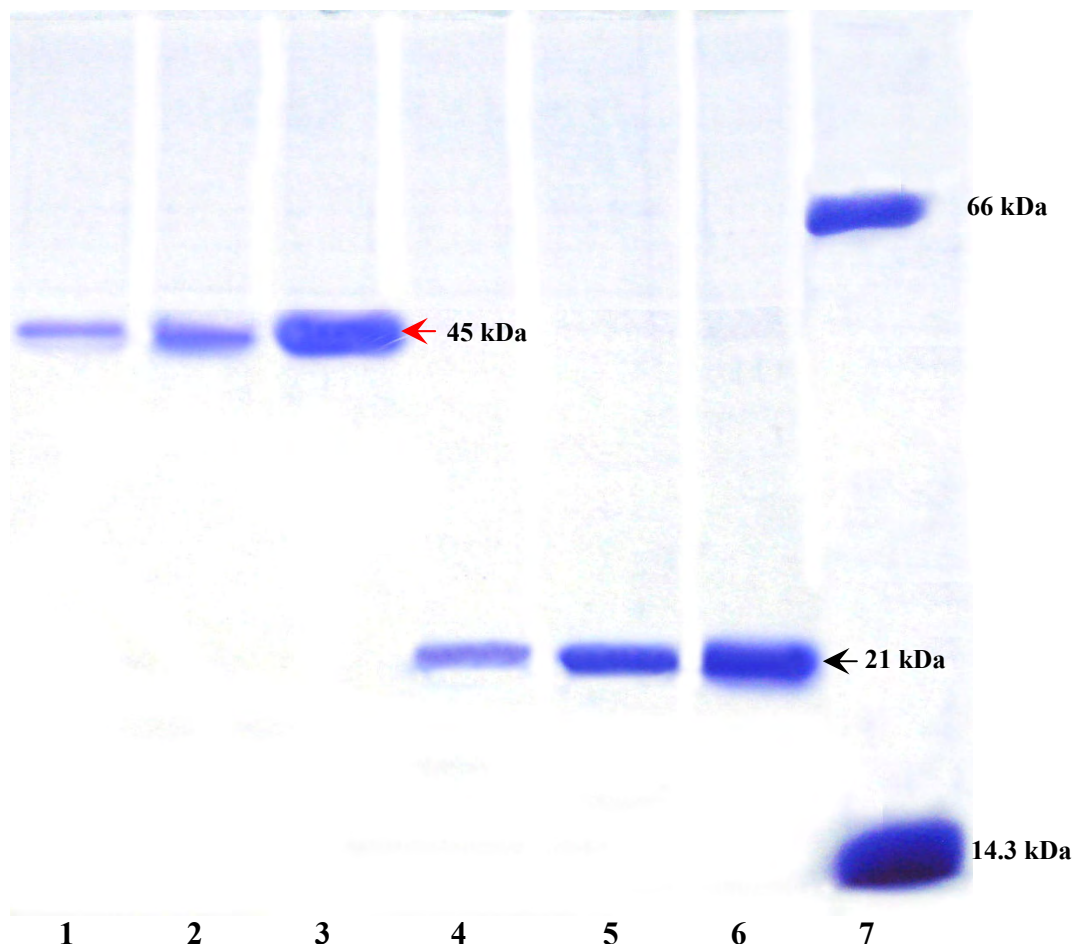
**Figura 41.-** PAGE-SDS en un gel resolutivo al 12% y un gel concentrador al 5%, de las colectas de la purificación por cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (bajo condiciones nativas), de la proteína recombinante IalB del clon 29 de la cepa recombinante *E. coli* BL21 Star (DE3), siguiendo la técnica ya estandarizada. (8) Marcador de peso molecular (seroalbúmina bovina y lisozima), (7) colecta del primer eluido, (6) colecta del segundo eluido, (5) sobrenadante del segundo lavado, (4) sobrenadante del primer lavado, (3) lisado unido a la resina agarosa-niquel, (2) sedimento remanente luego del lisado, (1) Sobrenadante no unido a la resina. Se observa a la proteína IalB pura con un peso molecular aproximado de 21kDa. La flecha señala la proteína IalB de 21 kDa colectada en el primer eluido.





**Figura 42.-** PAGE-SDS en un gel resolutivo al 12% y un gel concentrador al 5%, de las colectas de la purificación por cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (bajo condiciones nativas) de la proteína recombinante FlaA del clon 12 de la cepa recombinante *E. coli* BL21 Star (DE3). (1) Marcador de peso molecular (seroalbúmina bovina y lisozima), (2) sobrenadante no unido a la resina agarosa-niquel, (3) sobrenadante del primer lavado, (4) sobrenadante del segundo lavado, (5) primer eluido (6) segundo eluido, (7) tercer eluido, (8) lisado adicionado a la resina agarosa-niquel. Se observa a la proteína FlaA pura con un peso molecular aproximado de 45kDa. La flecha señala la proteína FlaA de 45 kDa colectada en el primer eluido.

La repurificación de las proteínas en resina de agarosa-Niquel, mejoró el grado de pureza de dichas proteínas recombinantes (Figura 43).



**Figura 43.-** PAGE-SDS en un gel resolutivo al 12% y un gel concentrador al 5%, de las proteínas recombinantes IalB y FlaA repurificadas por cromatografía de afinidad a metal inmovilizado bajo condiciones nativas. (1-3) Tercer, segundo y primer eluido respectivamente, de la proteína FlaA. (4-6) Tercer, segundo y primer eluido respectivamente, de la proteína IalB. La flecha roja señala la proteína recombinante FlaA de 45 kDa y la flecha negra muestra a la proteína recombinante IalB de 21 kDa.

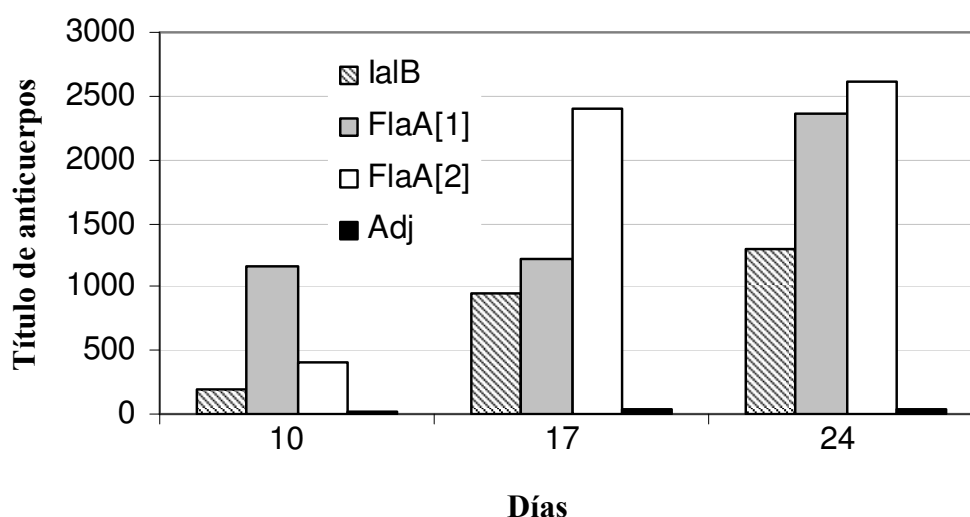
Las proteínas IalB y FlaA totalmente puras, fueron cuantificadas y liofilizadas, obteniendo aproximadamente 0.7 mg de IalB y 1.5 mg de FlaA. A partir de estos datos se podría decir, que el rendimiento de FlaA recombinante es mayor (practicamente en 2 veces) con respecto a IalB. Esta observación hay que tomarla con cuidado, desde que los factores que afectan la expresión de la proteína recombinante pueden ser muy variados, hay que remarcar que la metodología de proteína recombinante solo asegura la calidad de la proteína entre los diferentes batch, pero no su producción.

#### 4.11. Inmunogenicidad de las proteínas recombinantes IalB y FlaA

Las proteínas recombinantes repurificadas IalB y FlaA, administradas vía subcutánea a conejos adultos de raza Nueva Zelanda, fueron capaces de inducir respuesta inmune humoral. Los títulos de los anticuerpos de conejo contra la proteína recombinante IalB y FlaA de *Bartonella bacilliformis* fueron determinados por ELISA directo en diferentes tiempos después de las inmunizaciones, usando para ello un anticuerpo específico anti-IgG de conejo preparado en cabra y conjugado con peroxidasa de rábano (Tabla 5 y Figura 44). De los resultados obtenidos se debe indicar que los conejos inoculados con FlaA mostraron respuestas diferentes a pesar de tratarse de una misma muestra proteica recombinante en igual cantidad y condiciones de trabajo experimental, por lo que tal diferencia podría deberse a mecanismos inmunológicos propios del huésped desarrollados en presencia del antígeno.

**Tabla 5.-** Título de anticuerpos cuantificados por ELISA directo

Días	IalB	FlaA 1	FlaA 2	Control
0	0	0	0	0
10	186.6	1157.3	405.07	19.556
17	949.67	1213.6	2408.8	35.372
24	1292.3	2359.5	2619	32.817



**Figura 44.-** ELISA de las IgG obtenidas luego de la inoculación a los conejos con las proteínas repurificadas IalB y FlaA.

Los resultados muestran que las proteínas recombinantes IalB y FlaA emulsionadas en coadyuvante de Freund (completo para la primera dosis e incompleto en las dosis de refuerzo), fueron capaces de inducir respuesta humoral, obteniéndose elevados títulos de anticuerpos en las muestras de plasma colectadas a partir de sangre venosa de los conejos inoculados. La respuesta es específica para las proteínas recombinantes administradas, porque el conejo control que sólo recibió coadyuvante con PBS no mostró respuesta, con lo cual se puede concluir que la respuesta es específica. La respuesta de los animales a las proteínas IalB y FlaA es una respuesta progresiva en el tiempo. Elevados niveles de anticuerpos tipo IgG se alcanzaron con la segunda inmunización de los animales, y estos niveles de anticuerpos se incrementaron ligeramente o se mantuvieron luego de una tercera inmunización. Los niveles de anticuerpos en los animales que fueron inmunizados con proteína recombinante fueron mayores con respecto al animal que solo fue inmunizado con adyuvante (control). Los resultados que se muestran en la Figura 44, demuestran que la proteína recombinante FlaA podría ser más antigénica que la proteína IalB recombinante (este resultado no deja de ser preliminar).

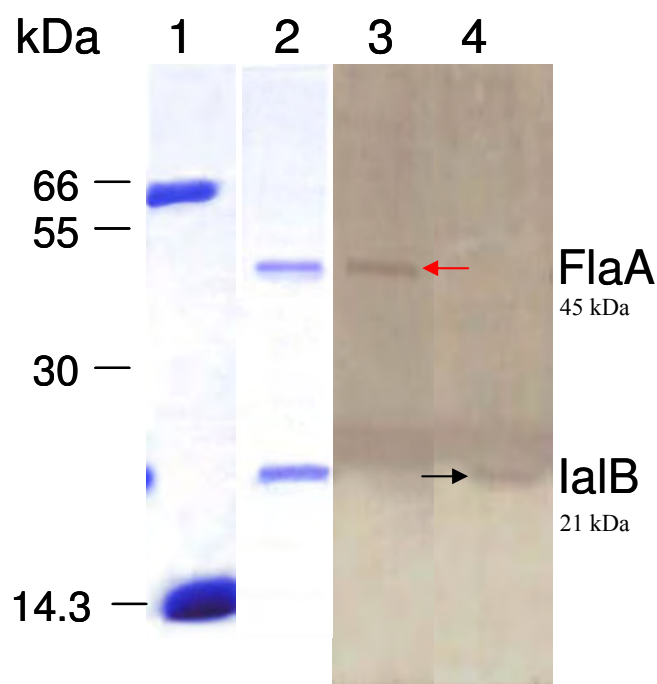
#### **4.12. Western Blot**

En el western blot ensayado para verificar la especificidad de los anticuerpos (IgG) obtenidos a partir de los plasmas de conejos inoculados y que fueron cuantificados por ELISA directo, se demostró que estos anticuerpos policlonales IgG generados, eran específicos en el reconocimiento de las proteínas recombinantes repurificadas que fueron inyectadas a los conejos adultos de raza Nueva Zelanda (Figura 45), es decir que estos anticuerpos eran IgG anti-IalB o IgG anti-FlaA y en cada caso daban una única banda de reconocimiento que correspondía al peso esperado para las proteínas FlaA e IalB (Figura 45, línea 3 y 4 respectivamente). Esta detección estaría indicando un reconocimiento específico.

Luego cuando estas IgG fueron enfrentadas a lisados totales de *Bartonella bacilliformis*, también se pudo visualizar un reconocimiento específico tal y como se presentó en el primer western blot en donde se enfrentó IgG contra proteínas recombinantes puras (Figura 45), no existiendo evidencia de alguna reactividad cruzada con otras proteínas presentes en los lisados totales (dato no mostrado).



Aunque estos resultados necesitan ser ampliados, sin embargo, indican que es posible realizar respuesta inmunogénica *in vivo* contra las proteínas recombinantes de *Bartonella bacilliformis*. Estos resultados son importantes para establecer las bases de un estudio inmunológico más extenso.



**Figura 45.-** Western Blot de las proteínas recombinantes IalB y FlaA repurificadas en resina de agarosa-Ni. Carriles: (1) marcador de peso molecular, (2) migración de IalB y FlaA conjuntamente, (3 y 4) western blot de mezcla de IalB y FlaA. La fracción de plasma de los conejos inmunizados con FlaA (carril 3) e IalB (carril 4) fue utilizado como primer anticuerpo, luego un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa fue utilizado para revelar la detección de FlaA e IalB recombinante (carriles 3 y 4, respectivamente). La flecha roja señala la proteína recombinante FlaA de 45 kDa y la flecha negra muestra a la proteína recombinante IalB de 21 kDa.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Cultivo de las cepas de *Bartonella*

Para el cultivo de las especies del género *Bartonella* se han utilizado una variedad de medios y suplementos, con la característica común que todos ellos son medios muy enriquecidos y requieren para su preparación cuidados extremos de esterilidad que eviten su rápida contaminación. Entre los medios empleados se tiene al agar de fases, medio de fase de Colichón, medio F1 más RPMI, agar Columbia o agar infusión cerebro corazón más plasma y sangre, ya sea humana, de carnero, conejo o caballo. En el caso específico de *B. bacilliformis* los medios más empleados para su cultivo han sido el agar Columbia con 5 o 10% de sangre de caballo (Birtles et al., 2002; Angelakis et al., 2008), agar Columbia más sangre de carnero al 5% (Biswas et al., 2007), agar infusión corazón o infusión cerebro con 5% de eritrocitos de carnero desfibrinados y 2.5% de plasma de carnero estéril (Battisti and Minnick, 1999; Callison et al., 2005), agar infusión cerebro corazón suplementado con 10% de plasma humano y 10% de lisado de sangre humana (Benson et al., 1986), agar infusión corazón más 5% de sangre de conejo (Brenner et al., 1991), etc. Con *B. elizabethae*, *B. vinsonii*, *B. clarridgeiae*, *B. bovis* y *B. henselae* se ha utilizado agar Columbia con sangre de caballo al 5% (Angelakis et al., 2008) y con sangre de carnero desfibrinada al 5% (Birtles et al., 1999; Sander et al., 2000; Biswas et al., 2007).

Dado que no existe condiciones estandarizadas y únicas en cuanto al cultivo de las especies de *Bartonella*, que permitan un crecimiento en el menor tiempo posible y con un mayor número de colonias, en el presente trabajo se consideró mejor realizar los cultivos tomando en cuenta las indicaciones de la hoja técnica que vino con cada una de las cepas patrones adquiridas del Instituto Pasteur de Paris-Francia, en donde recomiendan el uso de sangre de carnero para el cultivo de *Bartonella bacilliformis* y sangre de caballo para el resto de especies (*B. elizabethae*, *B. vinsonii*, *B. clarridgeiae*, *B. bovis* y *B. henselae*). Al revisar la literatura disponible que existe para los cultivos de las cepas de *Bartonella*, se pudo apreciar que cada investigador usa un medio en particular, con el cual puede obtener crecimiento celular en un número variable de días, ya que este tiempo no sólo dependerá del medio empleado

sino también de las condiciones externas que rodean al cultivo como es la temperatura, pH, humedad, CO<sub>2</sub>, etc, así como de las características intrínsecas de la cepa utilizada, pues se ha visto que hay algunas que crecen con mayor rapidez que otras y que eso tenga o no relación con el poder patogénico de cada una es algo que no se ha estudiado todavía o al menos no hay reportes al respecto.

En el cultivo de *B. bacilliformis* se consideró conveniente el empleo de paquete celular al 10% en lugar de sangre total de carnero con la intención de hacer mucho más enriquecido el medio, así también se emplearon medios bifásicos tomando en cuenta que como los cultivos demoraban en crecer hasta más de 6 semanas en algunos casos, entonces era necesario evitar la sequedad del agar. La fase líquida inicialmente consistía en una mezcla de caldo triptosa más plasma de carnero al 15%, sin embargo debido a la formación de pequeños grumos y gelificaciones producto posiblemente de la precipitación de proteínas propias del plasma, las cuales interferían con la cosecha de sólo células bacterianas además que al formar como un gel dificultaban una correcta aireación y humedad requerida en los cultivos, es que se empezó a usar el caldo infusión cerebro corazón (BHI) por ser un medio muy enriquecido que ya había sido empleado en el cultivo de este patógeno. La sangre de carnero utilizada en la preparación de los medios bifásicos repartidos en los tubos de vidrio, no fue sangre desfibrinada sino sangre recolectada en bolsas con citrato de sodio como anticoagulante y esto por la mayor facilidad y menor costo que significaba su obtención en relación a la sangre desfibrinada, la cual mostró dar mejores resultados al ser usada conjuntamente con frascos de cultivo celular desproteinizados que tenían tapas con filtro, ya que de 15 a 20 días que demoraban en crecer las cepas *B. bacilliformis* CIP 77.27 y *B. bacilliformis* CIP 57.18 el tiempo se redujo hasta 5 a 7 días, sin embargo por el mayor costo que significaba estandarizar los cultivos bajo estas condiciones se optó por seguir empleando sangre no desfibrinada y tubos de vidrio.

Con la sangre de caballo empleada en los cultivos de las otras especies de *Bartonella* también se observó la misma diferencia en cuanto a que si se usaba sangre desfibrinada y frascos de cultivo celular se reducía el tiempo en el que empezaban a crecer las cepas. Una particularidad de los cultivos con sangre de caballo era que conforme pasaban más días de incubación había lisis eritrocitaria ya

que la fase líquida se tornaba roja y luego marrón, detalle no observado con los cultivos de *B. bacilliformis*.

En general el aislamiento de las especies de *Bartonella* es poco exitoso y requiere condiciones especiales de cultivo (Maguiña y Gotuzzo, 2000), como es el empleo de medios enriquecidos suplementados con un tipo de sangre, los cuales deben ser mantenidos entre 25 a 37°C en un ambiente con 5% de CO<sub>2</sub>, e incubados por varias semanas (Huarcaya et al., 2001), sin embargo en el presente trabajo se consideró conveniente incubar todas las cepas a 28°C por ser la temperatura mínima alcanzada en el ambiente donde se estandarizó los hemocultivos y además por saber según investigaciones previas que temperaturas mayores a 30°C podían inducir inhibición de la expresión de ciertas proteínas indispensables en la acción invasiva de este patógeno intracelular (Coleman y Minnick, 2003).

Debido a la refringencia del vidrio de los tubos de ensayo y brillo de los frascos de cultivo celular, no se pudo obtener fotografías que ilustren con más detalle las características culturales de cada cepa de *Bartonella*, lo que se considera sería importante mostrar quizá con un mejor equipo fotográfico o algún microscopio con cámara incorporada, ya que en la literatura que existe sobre *B. elizabethae*, *B. vinsonii*, *B. clarridgeiae*, *B. bovis* y *B. henselae* es muy poco lo que se encuentra sobre descripciones de las colonias de cada especie a diferencia de *B. bacilliformis* de la que hay mejores detalles de cómo son las colonias en los cultivos, entonces para darse una idea preliminar de si el cultivo está o no contaminado el conocer morfologías, tamaño, color, borde, etc de las colonias de cada especie podría ser de mucha ayuda además de contribuir a identificar a las diferentes especies de *Bartonella* (Clarridge et al., 1995), a pesar que se ha visto que entre los diferentes sub-cultivos pueden existir cambios de las características de las colonias que crecían en la fase sólida empleada (Walker y Winkler, 1981), así como bastantes similitud entre las colonias de especies diferentes tal es el caso de *B. clarridgeiae* y *B. bacilliformis*. En una reunión consultiva sobre la Enfermedad de Carrión, organizada por el Instituto Nacional de Salud, que agrupó a diferentes investigadores de buena trayectoria científica, se dejó claro que no se sabía qué tipo de sangre o medio era el que brindaba mejores resultados en cuanto al cultivo de *B. bacilliformis*, por lo que sería interesante ejecutar un estudio que conlleve realizar en paralelo cultivos con

distintos medios y sangre a partir de un número de cepas adecuado y así dilucidar si existen o no cambios significativos entre uno u otro, sin dejar de tomar en cuenta el costo económico del cultivo elegido desde que esta patología se encuentra presente en áreas de pobreza donde los centros de salud cuentan con lo mínimo necesario para hacer su trabajo de diagnóstico clínico.

## **5.2. Diagnóstico de *Bartonella bacilliformis***

Con las PCR de colonia realizadas en las cepas de *B. bacilliformis* se confirmó la presencia del gen *ialB*, que a pesar de ser considerado un gen altamente conservado entre las especies de *Bartonella* que son patógenos humanos (Mitchell y Minnick, 1997) y haber hallado homólogos de *ialB* en otros patógenos bacterianos (Coleman y Minnick, 2003), se suponía hasta este momento según la literatura bibliográfica que era específico de *B. bacilliformis* por tener una secuencia nucleotídica única no presente en otro representante del género *Bartonella* (Padilla y Ventura, 2003). En este sentido la detección del gen *ialB* por PCR parecía ser útil como una herramienta para la identificación rápida de la bacteria *B. bacilliformis* por necesitar en su ejecución pocas células bacterianas en comparación a las que se requerían para hacer una extracción de DNA genómico.

Para las extracciones de DNA genómico de todas las especies de *Bartonella*, se tuvo que cosechar hasta un poco más del triple de sedimento celular del que se obtenía cuando se centrifugaba 3 mL de un cultivo de 18 horas de *E. coli*, porque de lo contrario la banda que se generaba al revelar las extracciones en un gel de agarosa al 1% era muy tenue, esto se debe a los exhaustivos lavados de las bacterias para eliminar los restos de los medios de cultivo los cuales poseen componentes que interfieren con el proceso de extracción del DNA genómico.

Las amplificaciones y posterior secuenciación del gen *16S rRNA* se realizaron para confirmar la pureza de las cepas estudiadas, no por dudar de la nominación brindada por el Instituto Pasteur, sino por la facilidad que existía en que los cultivos se contaminen con microorganismos ambientales. Además al no conocer con detalle las características morfológicas de las colonias que correspondían a cada especie, se prefirió asegurar que a pesar de los cuidados extremos considerados en las siembras

y preparación de los hemocultivos, no haya existido contaminación entre las especies de *Bartonella* al momento de efectuar los cultivos, pues entre los diferentes subcultivos se observó cambios de las características culturales de las colonias que crecían, lo que de alguna manera generaba la duda en cuanto a si los cultivos seguían tan puros como cuando se recibieron. La pureza se pudo corroborar de acuerdo a los análisis de alineamiento de las secuencias nucleotídicas obtenidas con la base de datos disponibles para el gen *16S rRNA* en el GenBank, los cuales mostraron altos índices de porcentajes de identidad con todas las cepas de *B. bacilliformis*, con *B. clarridgeiae* CIP 104772 y *B. vinsonii* subsp. *vinsonii* CIP 103738, excepto en el caso de las cepas *B. henselae* CIP 103737, *B. bovis* CIP 106692 y *B. elizabethae* CIP 103761. Los porcentajes de identidad menores al 90% quizá fueron producto de impurezas no detectadas en los amplicones que de alguna manera interfirieron con un buen secuenciamiento, ya que en los 3 casos los cromatogramas reflejaban picos sobrepuestos que necesitaba ser editados y limpiados, siendo necesario en todo caso repetir las PCR de secuenciamiento por ambos lados y hasta por duplicado. Sin embargo, estas cepas fueron estudiadas como cepas puras a pesar de porcentajes de identidad menores al 90%, debido a que las otras homologías encontradas en el análisis de cada una de estas 3 cepas, tenían porcentajes de identidad menores al 50% con los valores de E (expect value) más alejados del cero, lo cual sirvió para considerar aquellas homologías con identidades menores al 50% como no significativas, ya que E es un parámetro que describe el número de éxitos que se puede esperar por azar, teniendo en cuenta el tamaño de las secuencias comparadas, entonces cuanto más bajo es el valor de E o más cercano a 0, es más significativo.

El proceso de identificación de las especies del género *Bartonella* está cobrando cada día mayor importancia en razón al incremento en el número de infecciones humanas en las cuales estas bacterias están siendo involucradas, por lo que son considerados patógenos emergentes a nivel mundial (Avidor et al., 2004). Esto aunado a que es poco lo que se sabe sobre la biología de *Bartonella bacilliformis*, es que incrementa la necesidad de permanecer alertas en estudios que conlleven a entender y conocer mejor a este patógeno intracelular, evitando así su diseminación a nuevas áreas tropicales de extrema pobreza (Maguiña et al., 2001; Pachas, 2001).

Hasta la fecha en el Perú, además del patógeno *B. bacilliformis*, se han reportado otras 5 especies más del género *Bartonella*, que son *B. rochalimae* (Eremeeva et al., 2007), *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. quintana* y *B. koehlerae* (Raoult et al., 1999; Huarcaya et al., 2001; Huarcaya et al., 2002; Pozo et al., 2005). *B. henselae*, y *B. clarridgeiae* son agentes etiológicos identificados como causantes de la Enfermedad del Arañazo de Gato (EAG), que presenta un curso clínico más o menos benigno en pacientes no inmunosuprimidos (Huarcaya et al., 2001). La transmisión de EAG se realiza a través de mordidas, arañazos de gatos y picaduras de pulgas de gatos (Kordick et al., 1997; Maguiña y Gotuzzo, 2000). *B. quintana* es responsable de la patología de la fiebre de las trincheras (Batterman et al., 1995), sin embargo *B. quintana*, *B. henselae* y *B. clarridgeiae* pueden estar implicados en la etiopatogenia de la Angiomatosis Bacilar (AB) descrita en pacientes VIH seropositivos como en inmunocompetentes (Huarcaya et al., 2001).

En pacientes con sintomatología de EAG y AB, atendidos en el Hospital Cayetano Heredia, en clínicas privadas y en el Instituto de Salud del Niño en Lima – Perú durante el año 1998, se encontró por métodos serológicos como IFA a *B. henselae* y *B. clarridgeiae* como responsables de estas enfermedades, volviéndose a reportar el aislamiento de *B. clarridgeiae* de una pulga en el 2002 en la ciudad de Cuzco (Huarcaya et al., 2002; Huarcaya et al., 2003; Eremeeva et al., 2007). Así también, la presencia de *B. quintana* ha sido identificada en nativos de Urubamba y ectoparásitos en 1999 (Raoult et al., 1999).

En otro estudio realizado en la Provincia de Ayabaca – Piura el año 1999, se halló en la pulga de gato, *Ctenocephalides felis*, colectada de la ropa de cama de los pobladores, a *B. quintana*, *B. clarridgeiae*, *B. koehlerae* y *B. henselae* (Pozo et al., 2005). Además *B. quintana*, *B. henselae* y *B. koehlerae* han sido reportadas como responsables de endocarditis en humanos, esto a través de secuenciamientos del DNA de los productos PCR de los genes *gltA* y *ribC* (Avidor et al., 2004; Blanco y Raoult, 2005). La recientemente *B. rochalimae* aislada de una mujer natural de EEUU que visitó las líneas de Nazca, el valle sagrado de Urubamba y Machu Picchu, en base a estudios comparativos de los genes *16S rRNA*, *gltA*, *rpoB*, y del espacio intergénico *16S rRNA-23S rRNA*, fue ubicada filogenéticamente más estrechamente relacionada a *B. clarridgeiae* que a *B. bacilliformis* (Eremeeva et al., 2007) y esta

especie fue responsable de sintomatologías como fiebre, insomnio, mialgias, náusea, dolor de cabeza y leve tos, cuadro clínico comparable a la fase hemática de la Enfermedad de Carrión.

En relación al diagnóstico de *B. bacilliformis*, los métodos actualmente utilizados tienen muchas limitaciones y no se dispone de un método sencillo de campo que permita detectar a las personas infectadas en las zonas endémicas, no existe un método de diagnóstico rápido para los casos agudos y crónicos en las zonas endémicas, tampoco hay forma de detectar a los portadores asintomáticos y se carece de esquemas de tratamiento para los portadores (Pachas, 2001), siendo entonces indispensable desarrollar investigaciones que conduzcan a mejorar este aspecto. Las pruebas de laboratorio que se utilizan para confirmar la Enfermedad de Carrión, dependen de la fase en que se encuentra la enfermedad, tipo de muestra colectada, disponibilidad de equipos e infraestructura, y la existencia de personal entrenado en los laboratorios locales, regionales o nacionales (Pachas, 2001). Dentro de las pruebas utilizadas para el diagnóstico de la enfermedad, están el frotis sanguíneo, hemocultivo, PCR, IFA, ELISA, Western Blot, además de cultivos de biopsias e histopatología casos en fase eruptiva (Pachas, 2001; Blanco y Raoult, 2005).

El frotis de sangre periférica es un método sencillo y uno de los más comunes métodos de diagnóstico preliminar de *B. bacilliformis*, por ser fácil, de bajo costo y rápido de realizar, pero tiene el inconveniente que es poco sensible, en general 24%, y depende principalmente de dos factores: una buena toma de muestra y de personal debidamente capacitado para la lectura del frotis, por consiguiente no es útil para el diagnóstico ni seguimiento (Cáceres et al., 1995; Ellis et al., 1999). Además este porcentaje varía dependiendo de la forma clínica de la enfermedad, edad del paciente, presencia o ausencia de palidez e ictericia, temperatura al momento de colecta de la muestra, velocidad de sedimentación y hemoglobina ((Maguiña, 1998; Pachas et al., 2004; Ventura y Padilla, 2006).

El diagnóstico por hemocultivo es un poco más sensible que el frotis, aunque algunos indican que es de 24.1% no se sabe exactamente el porcentaje de sensibilidad, siendo el gold estándar de consenso para aislar *B. bacilliformis*, sin embargo para su realización se necesita mayor infraestructura y tecnología; además



requiere de la preparación de medios de cultivo muy enriquecidos, que fácilmente se contaminan (tasa de contaminación de 7 al 20%), ambientes especiales con cámara de flujo laminar para realizar la siembra, una temperatura de incubación de 28°C, periodos de incubación prolongados hasta por seis a ocho semanas y sub-cultivos sistemáticos de los cultivos primarios negativos para incrementar la sensibilidad.

El diagnóstico serológico a través de aglutinaciones con suspensión de los cultivos tiene una sensibilidad de 28.7%. Los métodos serológicos más desarrollados actualmente son el inmunoblot o wester blot, ELISA e IFA. Aunque el inmunoblot rinde alta sensibilidad (70 a 94%) y especificidad, se han encontrado reacciones cruzadas con *Brucella*, *Coxiella burnettii* y *Chlamydia psittaci* (Birtles et al., 2000). El ELISA necesita la preparación de un antígeno altamente purificado que requiere de tecnología complicada y es de alto costo, además que se han encontrado reacciones cruzadas entre las diferentes *Bartonella* spp. y con especies de *Coxiella* y *Chlamydia* (Pachas, 2001). El western blot o inmunoblot (Mallqui et al., 2000) al igual que la IFA son técnicas relativamente simples, de bajo costo y no requieren de equipos de alta tecnología; siendo técnicas con una sensibilidad del 82% y especificidad del 92% que más se adecuan para nuestro medio, sin embargo requieren la detección de antígenos específicos de *B. bacilliformis* que eviten reacciones cruzadas con *Salmonella*, *B. henselae*, *Coxiella*, *Chlamydia* y *Treponema pallidum* (Knobloch et al., 1985; Knobloch, 1988; Chamberlin et al., 2000; Pachas, 2001).

Dado estos inconvenientes de reacciones cruzadas, lo lento del crecimiento celular y baja sensibilidad del cultivo, se propusieron test de amplificación de ácidos nucleicos (NAATs), los cuales tenían mejor sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, debido a que detectaban material genético en muestras clínicas en lugar del microorganismo viable, a través de una serie de técnicas de amplificación que incluyen la PCR, amplificación mediada por transcripción, etc (Persing et al., 2004). Muchas pruebas de PCR han sido reportadas para el diagnóstico de la Enfermedad de Carrión, entre estas pruebas destaca la amplificación del gen *16S rRNA* (Relman et al., 1990), que luego era caracterizado por secuenciamiento del amplicón o era analizado con sondas de DNA. Hasta la actualidad este gen al ser muy conservado sigue siendo empleado como un método de diagnóstico referencial,

sin embargo no es adecuado debido al alto porcentaje de similaridad que existe entre las secuencias de este gen entre las diferentes especies de *Bartonella* (Renesto et al., 2001). Otras alternativas más útiles fueron la PCR del espacio intergénico *16S rRNA*-*23S rRNA* usando oligonucleótidos universales (Birtles et al., 1999) y PCR de los genes *rpoB*, *ribC* y *gltA* usando oligonucleótidos específicos para *Bartonella* (Birtles et al., 2002; Avidor et al., 2004), seguido por análisis con diferentes enzimas de restricción (PCR-RFLP) (Maurin et al., 1997) y secuenciamientos para identificar a *B. bacilliformis* y diferenciarlo de otras especies como *B. clarridgeiae* (Renesto et al., 2001), pero en algunos casos no fue posible distinguir entre varias especies de *Bartonella*, además que siempre estaba presente el riesgo de contaminación de la muestra lo que podía dar falsos positivos haciendo imperante seguir ensayando en otras alternativas. Sin embargo, ninguna de estas pruebas de PCR han sido diseñadas y evaluadas para la detección específica de *B. bacilliformis* en muestras clínicas, por lo tanto se desconoce su valor diagnóstico (Padilla y Ventura, 2003; Avidor et al., 2004).

En base a esta necesidad, posteriormente se reportó la estandarización y aplicación de una prueba de PCR del gen *ialB* para la detección de *B. bacilliformis* en muestras clínicas (Padilla y Ventura, 2003). Homólogos de este *ialB* se han encontrado en *B. quintana* (gen *invB*), *B. henselae* (gen *invB*) y *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, las cuales comparten similitudes fenotípicas como ser transmitidas por vectores artrópodos, ser parásitos intracelulares facultativos y requerir hemina para su crecimiento. Además, *B. quintana*, *B. henselae* y *B. bacilliformis* pueden adherirse e invadir eritrocitos (Kordick and Breitschwerdt, 1995; Rolain et al., 2002) y células endoteliales durante el curso de la enfermedad (Batterman et al., 1995; Dehio et al., 1997), entonces *ialB* podría compartir funciones similares contribuyendo a la virulencia de esas tres especies (Coleman y Minnick, 2003), encontrándose similitud en un 70 a 85% entre el locus de invasión *ialAB* de *B. henselae* y el de *B. bacilliformis*.

De esta manera, se estimó indispensable verificar si realmente el gen *ialB* era único y específico de la especie *B. bacilliformis*, para lo cual a partir del DNA genómico de las 6 especies trabajadas se ensayó una PCR utilizando oligonucleótidos específicos del gen *ialB* de *B. bacilliformis*, los cuales que fueron diseñados a partir

de la secuencia nucleotídica disponible en el GenBank (Nº de acceso L25276). En general los ensayos de PCR fueron desarrollados con éxito debido probablemente a un buen diseño de oligonucleótidos y que las extracciones de DNA genómico fueron realizadas con kits comerciales que permitieron obtener muestras de alta pureza a pesar de la dificultad de conseguir un buen sedimento celular libre de precipitados o restos de eritrocitos, etc, que se verificó por ensayos paralelos inhibían reacciones de amplificación realizadas con enzimas como la TernalAce (Invitrogen), por lo que en el presente trabajo se utilizó las enzimas AccuPrime<sup>TM</sup> *Taq* DNA polymerase High Fidelity, AccuPrime<sup>TM</sup> *Pfx* DNA polymerase y PCR Expand High Fidelity con muy buenos resultados.

El haber encontrado un producto PCR de aproximadamente 558 pb a partir de colonia y del DNA genómico de *B. clarridgeiae* (Figura 17), con los oligonucleótidos y ciclo de amplificación usados para el gen *ialB* de *B. bacilliformis* permitió indicar que este gen *ialB* no sería único y específico de la especie *B. bacilliformis*, o que este gen de invasión no sería muy divergente de otros locus de invasión similares como fue propuesto anteriormente (Padilla y Ventura, 2003). Además si a esto se le añade que *B. clarridgeiae*, es la otra representante del género *Bartonella* que es móvil y tiene flagelo (Birtles et al., 1999), cuyo gen de flagelina está estrechamente relacionado al gen *flaA* de *B. bacilliformis* (Sander et al., 2000) y que en recientes investigaciones se ha encontrado una proteína hipotética que sería codificada por el gen *ialB* en *B. tribocorum* CIP 105476 (Nº de acceso AM260525) de 561 pb, el cual no ha sido comparado con el gen de *B. bacilliformis* a fin de ver que tanta homología habría entre ellos, entonces descartaría por completo la utilidad de este marcador molecular para el diagnóstico rápido y específico de *B. bacilliformis*. Por ende en la necesidad de hacer un diagnóstico seguro y factible de ejecutar, se debe tener el cuidado necesario de elegir adecuadamente el marcador a emplear, es así que a partir de los resultados obtenidos no cabe ninguna seguridad en el empleo de *ialB* teniendo entonces que seguir desarrollando ensayos con otros genes que se verifiquen sean específicos del patógeno *B. bacilliformis* además que sería recomendable analizar si el gen *ialA* también está presente en *B. clarridgeiae* y de ser así evaluar que tanta similaridad tiene con *B. bacilliformis*.

A todo esto además hay que agregar que todos los cultivos de *B. bacilliformis* no producen colonias de una única morfología, y en los sub-cultivos se mantiene esta diferencia lo que ya ha sido previamente reportado (Walker y Winkler, 1981), entonces la hipótesis que los cultivos permitirían quizá aislar e identificar entre las diferentes especies de *Bartonella*, quedaría descartada al haber encontrado que las características morfológicas de las colonias de las especies *B. bacilliformis* y *B. clarridgeiae* son muy similares si es que no idénticas, limitando la utilidad de los hemocultivos, ya que sólo se podría quizá llegar hasta nivel de género pero no de especie. El haber obtenido un porcentaje de identidad de 96% y un E value no tan cercano a cero, entre las secuencias nucleotídicas de los productos PCR de *B. bacilliformis* y *B. clarridgeiae* generaría la obligación de realizar nuevas amplificaciones y secuenciamientos de este gen entre ambas especies, antes de indicar con certeza que *B. clarridgeiae* tiene también presente el mismo gen *ialB* de *B. bacilliformis*. Además la secuencia nucleotídica recuperada a partir de *B. clarridgeiae* estaba incompleta, sin codón de inicio y no tan limpia, lo que reafirma la necesidad de repetir este ensayo.

Teniendo en cuenta que *B. clarridgeiae* ha sido aislada también de gato, cuy, zorro en los departamentos de Amazona y Cajamarca, ambos catalogados como zonas de mayor incidencia de Enfermedad de Carrión, por el número de casos reportados hasta la semana epidemiológica número 25 del año en curso (Boletín Epidemiológico, 2008), y que esta especie ya ha sido reportada en casos humanos en Lima- Perú, podría generar la preocupación de posibles nuevos reportes de humanos infectados con *B. clarridgeiae* así como algunas confusiones al momento de diagnosticar entre esta especie y *B. bacilliformis*, ya que si bien es cierto las manifestaciones clínicas ayudan a inclinarse en la sospecha de determinada patología como EC, EAG o AB, también se sabe que esto no es del todo exacto y hay sintomatologías variables y hasta comunes entre estas infecciones humanas.

### **5.3. Susceptibilidad antimicrobiana de *B. bacilliformis***

Hace más de 50 años se demostró en el Perú, mediante diferentes investigaciones de pruebas de inhibición *in vitro*, que *Bartonella bacilliformis* es sensible a muchos antibióticos como los betalactámicos, aminoglucósidos, cloranfenicol, rifampicina,

macrólidos, tetraciclinas, fluoroquinolonas (ciprofloxacino) y cotrimoxazol (Sobraques et al., 1999). Los actuales estudios han confirmado dicha sensibilidad a través de los MICs, sin embargo según los escasos estudios descriptivos que se han publicado, se observa que por lo general cualquier antibiótico fracasa cuando es administrado como monoterapia, debido a que se presentan recaídas o casos de portadores asintomáticos, incluso los esquemas que usan dos antibióticos tienen cierta tasa de fracaso que va del 10 al 30% de resistencia clínica (Rolain et al., 2004; Biswas et al., 2007).

Las limitaciones que existen para contar con un mayor número de cepas clínicas, hacen que el número extremadamente escaso de aislados analizados tanto *in vitro* como *in vivo*, no permita obtener conclusiones sobre las posibles diferencias entre los mecanismos de resistencia a quinolonas en cepas resistentes obtenidas por cualquiera de las dos maneras, como ya se ha descrito en otras especies según la literatura consultada (Ruiz, 2003).

La resistencia a quinolonas está relacionado con una serie de diferentes mecanismos (Ruiz, 2003; Saenz et al., 2004; Robicsek et al., 2006). El más relevante de estos mecanismos es la presencia de alteraciones en los blancos de acción de las quinolonas, principalmente a nivel de las proteínas GyrA y ParC (Ruiz, 2003). Aunque ya se han descrito una serie de diversas mutaciones puntuales, en gran medida las más importantes se ubican en los aminoácidos de las posiciones 83 y 87 en la proteína GyrA, así como en los aminoácidos ubicados en la posición 80 y 84 de la proteína ParC (numeración de *E. coli*).

En lo que respecta a *E. coli* los aminoácidos silvestres en las posiciones 83 y 87 de GyrA es la serina (Ser) y el ácido aspártico (Asp), respectivamente; y los que se encuentran en las posiciones 80 y 84 de ParC es la serina y el glutámico (Glu), respectivamente. La importancia de estos aminoácidos ha sido asociado con ciertos mecanismos de interacción entre las quinolonas y sus blancos de acción (Ruiz, 2003). Diferentes substituciones a nivel de esos aminoácidos, en algunas de las bases de los codones (mutaciones puntuales) que codifican cualquiera de estos aminoácidos, resulta en diversos grados de resistencia frente a los antibióticos de la familia de las quinolonas, que incluye al ácido nalidíxico (quinolona) y ciprofloxacino

(fluoroquinolona). Así, en *E. coli*, se ha descrito que la presencia de una alanina (Ala) en el aminoácido de posición 83 en la proteína GyrA resulta en un descenso de la susceptibilidad a fluoroquinolonas (ciprofloxacino) que normalmente no llega a resistencia, pero muestran bajos niveles de resistencia a ácido nalidíxico (Tavio et al., 1999; Vila et al., 2000; Vila et al., 2001). Es decir que una mutación puntual que origine la presencia de los tripletes GCA, GCG, GCT o GCC en lugar de TCT, TCC, TCA, TCG, AGT o AGC, afecta en buenas proporciones la MIC frente a ciprofloxacino, y dependiendo de que tanto aumente esta MIC entonces haría que las cepas se sigan comportando como sensibles, o quizá intermedias o resistentes. Sin embargo en relación al ácido nalidíxico no ocurre lo mismo, ya que con la presencia de una Ala en la posición 83 de *E. coli*, la MIC frente a este antibiótico no se altera mucho, entonces las cepas desarrollan resistencia pero la MIC estaría justo por encima del punto de corte, que son los valores referenciales que separan lo que se considera sensible e intermedio de resistente (Ruiz, 2003). Además, se sabe que mutaciones adicionales a la posición 83, ubicadas en otros puntos de la QRDR de GyrA o ParC significaría el desarrollo de resistencia también a ciprofloxacino (Vila et al., 2000; Ruiz, 2003; Angelakis et al., 2008).

Tres de los aislados, que son las cepas *B. bacilliformis* CIP 57. 17, *B. bacilliformis* CIP 57. 18 y *B. bacilliformis* CIP 57. 20, presentaban una MIC frente a ciprofloxacino de 0.125 a 0.25 µg/mL, lo cual se debe interpretar como cepas con sensibilidad disminuida, ya que no existe un punto de corte establecido para las especies de *Bartonella*, a diferencia de *E.coli*, donde se considera resistente a ciprofloxacino, si la MIC es mayor o igual a 2. Entonces esos valores obtenidos en las cepas de *B. bacilliformis* sugiere una pobre interacción entre ciprofloxacino y sus blancos probablemente debido a la presencia de aminoácidos específicos ya mencionados, a partir de lo cual resultaría interesante por ejemplo clonar el gen *gyrA* de *B. bacilliformis* en *E. coli* para poder evaluar como se ve afectada la resistencia. Los otros dos aislados antiguos (*B. bacilliformis* CIP 57. 19 y *B. bacilliformis* CIP 57. 27) tenían una MIC para ciprofloxacino > 32 µg/mL, aunque ninguna mutación en las secuencias analizadas de las QRDR de los genes *gyrA* y *parC* fueron detectadas. No obstante, *in vitro* mutantes resistentes a quinolonas podrían exhibir mecanismos inusuales de resistencia (Ruiz, 2003), los presentes resultados están en

concordancia con aquellos obtenidos en estudios previos (Minnick et al., 2003), en los cuales analizando *in vitro* mutantes de *B. bacilliformis* resistentes a ciprofloxacino, fueron obtenidas 15 mutantes en las cuales ninguna alteración fue encontrado a nivel del gen *gyrA*. Por lo tanto, es posible que las cepas *B. bacilliformis* CIP 57. 19 y *B. bacilliformis* CIP 57. 27 presenten mutaciones ubicadas fuera de las regiones analizadas (QRDR) de los genes *gyrA* y *parC*, o en todo caso a nivel de otros genes como por ejemplo en los genes *gyrB* o *parE*, o quizá sobreexpresiones estables o inestables de alguna bomba de eflujo capaz de bombear hacia afuera las quinolonas. En el caso de la cepa aislada más recientemente como es la *B. bacilliformis* 35096, la total resistencia a ciprofloxacino fue asociada con la presencia del aminoácido valina (Val) en la posición 91 de la proteína GyrA. La substitución de Ala por Val en la posición equivalente de *E. coli* que sería la 83, ha sido previamente descrita, indicando que fue producto de la transversión de C a T que ocasionó la presencia del codón GTG, resultando en similares alteraciones en la susceptibilidad para ciprofloxacino (Tavio et al., 1999).

La resistencia al ácido nalidíxico es considerada un factor de riesgo para el desarrollo de resistencia a las fluoroquinolonas (Khan et al., 1997; Wain et al., 1997; Ruiz et al., 2002). Interesantemente, en el único estudio en donde la frecuencia de mutación *in vitro* de ciprofloxacino en *B. bacilliformis* fue calculada (Minnick et al., 2003), los resultados conseguidos están en el mismo rango que aquellos obtenidos para los aislados clínicos de *E. coli* ácido nalidíxico resistentes que presentan una substitución en GyrA. Así, los resultados obtenidos demuestran claramente el riesgo del uso de las fluoroquinolonas en el tratamiento contra infecciones producidas por *B. bacilliformis*, y muestran la necesidad de analizar la posible presencia de fallas terapéuticas o recaídas en el curso de tratamientos con ciprofloxacino, debido a que las cepas que presentan una MIC a ciprofloxacina de 0.25 µg/mL o similar, tienen una gran facilidad para adquirir nuevos mecanismos de resistencia, ya sean por nuevas mutaciones, o alteraciones de permeabilidad que les permitiría adquirir resistencia completa a ciprofloxacino y quizá a otras fluoroquinolonas.

Para nuestro conocimiento, en la actual literatura no existen reportes de fallas terapéuticas durante tratamientos con ciprofloxacino en pacientes con Enfermedad de Carrión. Sin embargo, el hecho que las áreas endémicas donde se reportan casos con

infecciones causadas por *B. bacilliformis* estén localizadas en las regiones más pobres de las ciudades andinas, podrían quizá estar ocultando la presencia de dichas fallas en el tratamiento y no necesariamente sea porque no se hayan ya producido algunos casos de esta naturaleza. Además si se tiene presente que sólo los antibióticos con penetración intracelular y actividad bactericida son capaces de erradicar a *B. bacilliformis* (Sobraques et al., 1999), y siendo ciprofloxacino un antibiótico de este tipo entonces es comprensible que haya sido seleccionado como útil en la erradicación de este patógeno (MINSA, 2003; Rolain et al., 2004; Tarazona et al., 2006) pero también debe indicarse que ya se han reportado casos aún no publicados de persistencia del patógeno (22.6%) post tratamiento con ciprofloxacino (estudio realizado por el Dr. Pachas en San Ignacio – Cajamarca, durante los años 2004 al 2006) así como mutantes resistentes *in vitro* (Minnick et al., 2003), por lo cual es necesario señalar que los esquemas de tratamiento actuales no eliminan a *B. bacilliformis* de la sangre.

El presente trabajo constituye un estudio preliminar diseñado para validar la hipótesis respecto a que existiría una resistencia intrínseca de *B. bacilliformis* frente a las quinolonas, siendo por ende necesario realizar estudios que impliquen un mayor número de aislados clínicos recientes que hayan recibido tratamiento que permitan evaluar los niveles de susceptibilidad para las quinolonas, incluyendo al ácido nalidíxico, estableciendo luego la presencia de posibles substituciones en el QRDR de las proteínas GyrA y ParC. Sin embargo, el hecho de que todas las cepas analizadas de *B. bacilliformis* aislados previamente a la introducción de las quinolonas en el uso terapéutico, presenten una alanina tanto en la posición 91 de GyrA como en la 85 de ParC, las cuales serían equivalentes a las posiciones 83 de GyrA y 80 de ParC en *E. coli*, demostraría que esta es la secuencia original de estos 2 genes indicando que esa alanina sería el aminoácido silvestre, así como también ha sido introducido en la base de datos del GenBank, y que esto no sería una mutación debido a la presión ejercida sobre este patógeno por el uso de las quinolonas, siendo por consiguiente inadecuado usar ciprofloxacino como medida terapéutica contra la Enfermedad de Carrión (Angelakis et al., 2008).

A pesar del pequeño número de cepas analizadas en cuanto a susceptibilidad antimicrobiana, los resultados de este trabajo podrían dar lugar a desalentar a los



profesionales de la salud con respecto al uso de quinolonas en el tratamiento de infecciones por *B. bacilliformis*, demostrando la urgencia de realizar una vigilancia de la actual situación clínica para evaluar la posible necesidad de cambios en la terapia antimicrobiana contra este patógeno en países afectados, como es el Perú, en donde por normativa técnica del Ministerio de Salud con relación al tratamiento de la Enfermedad de Carrión, se sugiere a la ciprofloxacino (fluoroquinolona) como antibiótico de primera elección en casos agudos no complicados y en los graves complicados a la misma ciprofloxacina en combinación con otro como ceftriaxona. Debería indagarse más a fondo sobre otras alternativas propuestas en reportes recientes de estudios *in vitro* como *in vivo* (Rolain et al., 2000; Biswas et al., 2007), en los cuales indican que para el tratamiento de la Enfermedad de Carrión en cualquier fase, se requerirían de la combinación de dos antibióticos como la gentamicina y doxiciclina, para los cuales no se ha detectado resistencia (Biswas et al., 2007). Así también tomar en cuenta los trabajos que dan a conocer que existe gran discordancia entre la actividad *in vitro* de los antibióticos y su eficacia clínica, ya que la mayoría de *Bartonella* sp. son verdaderamente sensibles *in vitro* a muchos antibióticos, tales como gentamicina, tetraciclina, doxiciclina, minociclina, eritromicina, azitromicina, claritromicina, amoxicilina, cefotaxima, ceftriaxona y rifampicina, y tienen sensibilidad variable a otros como la clindamicina, quinolonas y cotrimoxazol; pero en la práctica clínica estos antibióticos son menos eficaces (Massei et al., 2005).

Para establecer lo planteado sin duda, es necesario diseñar y realizar estudios prospectivos con tamaño muestral adecuado que impliquen un mayor número de cepas clínicas aisladas a partir de casos comprobados a través de frotis, cultivo y pruebas moleculares, en diferentes áreas endémicas con pacientes complicados y no complicados, tanto para caracterizar los blancos de las quinolonas así como los niveles de susceptibilidad para ácido nalidíxico y otras fluoroquinolonas más modernas, ya que es una urgente necesidad el uso de antibióticos bactericidas en la lucha contra *B. bacilliformis*.

#### 5.4. Expresión e inmunogenicidad de las proteínas recombinantes IalB y FlaA de *B. bacilliformis*

Si bien es cierto en *B. bacilliformis* se han encontrado 24 proteínas antigénicas ubicadas a nivel de pared celular, membrana externa y en el citoplasma, por ensayos de inmunoprecipitación y western blot, utilizando sueros de conejos y de pacientes con anticuerpos antibartonela, no todas ellas se han verificado que sean inmunoreactivas o inmuno-específicas de *B. bacilliformis*, porque en algunos casos se han encontrado reacciones cruzadas con *Salmonella*, *Brucella*, *Coxiella*, *Chlamydia* y *B. henselae* (Minnick, 1994; Pachas, 2001). Los tres principales determinantes de virulencia de *B. bacilliformis* son la proteína deformina, los flagelos y las proteínas IalA e IalB codificadas por el locus asociado a la invasión *ialAB* (Dehio, 2004).

El locus *ialAB* de *B. bacilliformis* es responsable de la invasividad al eritrocito humano de acuerdo a lo observado en *E. coli*, la cual adquiere un fenotipo con capacidad de invadir eritrocitos humanos *in vitro* luego que se le clonó este locus *ialAB* de *B. bacilliformis* (Mitchell y Minnick, 1995). El gen *ialB* consta de 558 pb y codifica una proteína madura de aproximadamente 18 kDa, la cual ahora se sabe se ubica a nivel de membrana interna y no es exportada a la superficie bacteriana como antes se pensaba debido a que tenía una secuencia señal secretoria de 22 aminoácidos y más 60% de similaridad aminoacídica a la proteína asociada a invasión Ail de *Yersinia enterocolitica* y Rck de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Coleman y Minnick, 2001). Además se ha demostrado en cepas mutantes de *B. bacilliformis* que tienen alterada la secuencia del gen *ialB* una disminución de hasta 53% en la adhesividad e invasividad al eritrocito (Mitchell y Minnick, 1997; Dehio, 2001). Del mismo modo, a través de experimentos *in vivo* con el patógeno de rata *B. tribocorum*, se confirmó que *ialB* es un factor de virulencia que tiene un efecto significativo e intervendría directamente en el parasitismo del eritrocito, ya que cepas de esta especie con el gen *ialB* mutado fallaban en desarrollar bacteremia e invadir los eritrocitos de rata *in vivo*. Al estar la proteína IalB localizada en membrana interna entonces se piensa que su función sería transductora o transportadora de alguna molécula, pero hasta la fecha según comparaciones a nivel de otras proteínas homólogas presentes en otros patógenos, como *Brucella melitensis* que tienen cierta asociación parasítica o mutualística con células eucariotas, no se ha podido dilucidar

aun una función en particular, lo que conlleva a pensar en un papel único e inusual de invasividad al eritrocito (Coleman y Minnick, 2003). En cambio el gen *ialA* ayudaría a reducir los niveles de stress ayudando a la sobrevivencia bacteriana ya que elimina los derivados nucleotídicos tóxicos de la célula y regula los niveles de nucleótidos de señalamiento importantes y sus metabolitos, pero cómo esta actividad enzimática de IalA estaría relacionada con el proceso de invasión al eritrocito es desconocido (Minnick et al., 1996; Dehio, 2004), por esta razón, su estudio como posible inmunógeno sería muy interesante de desarrollar a futuro.

*B. bacilliformis* es altamente móvil debido a la expresión de múltiples flagelos unipolares, cuyo componente mayoritario es la proteína flagelina (FlaA) (Scherer et al., 1993; Gallegos et al., 2005). Estudios *in vitro* con eritrocitos humanos demostraron que la movilidad bacteriana se correlaciona con la adherencia bacteriana, ya que cepas no móviles obtenidas por mutagénesis dirigida de FlaA muestran una capacidad reducida de unión al eritrocito humano, esta reducción puede ser hasta un 75% o no lo invaden (Benson et al., 1986; Mernaugh e Ihler, 1992; Battisti y Minnick, 1999; Minnick y Anderson, 2000). Así mismo, anticuerpos dirigidos contra la subunidad de flagelina inhiben la unión al eritrocito y suprimen casi totalmente la invasión eritrocitaria (Scherer et al., 1993). Lo que no se ha demostrado es si los flagelos se unen directamente a los eritrocitos o si la energía dependiente de la movilidad realza la colisión eritrocito – bacteria. Esto último se sugiere en base a que especies no móviles como son *B. henselae*, *B. quintana* y *B. tribocorum* son capaces de invadir eritrocitos (Kordick y Breitschwerdt, 1995; Rolain et al., 2002), lo cual podría hacer pensar en un papel no esencial del flagelo en el proceso de invasión en estas especies (Dehio, 2004). La flagelina ya ha sido propuesta como antígeno para pruebas serológicas que permitan detectar patógenos como *Helicobacter pylori*, *Burkholderia pseudomallei*, *B. clarridgeiae*, etc (Sander et al., 2000; Gallegos et al., 2005).

En la presente investigación se eligió a los genes *ialB* y *flaA* por estar ambos comprometidos de manera más directa en el parasitismo del eritrocito humano, además que estos genes han sido ampliamente caracterizados y evaluados en ensayos de virulencia *in vitro* en donde se ha confirmado que alguna alteración en su secuencia nucleotídica inhibe su correcta expresión, y anula o disminuye su

capacidad de adherencia e invasividad al eritrocito humano (Coleman y Minnick, 2003; Gallegos et al., 2005). A pesar que *ialA* también constituye un gen que participa en la invasividad del eritrocito, no pudo ser considerado para evaluar su posible potencial inmunogénico, porque al realizar ensayos preliminares donde a pesar de haber conseguido clonar el gen en el vector TOPO y haber verificado que estaba en correcto marco de lectura no se pudo lograr que se expresará, motivo por el que se destinó repetir todo de nuevo en un estudio posterior. Es así que se decidió evaluar las proteínas recombinantes IalB y FlaA como posibles candidatos inmunógenos capaces de inducir alguna respuesta inmune en el huésped infectado, que permita en estudios posteriores neutralizar la patogenicidad de *B. bacilliformis* luego de enfrentarla a anticuerpos específicos dirigidos contra estos dos factores de virulencia.

Debido a que el cultivo *in vitro* de *B. bacilliformis* es costoso y el crecimiento es escaso y lento, lo que dificulta la extracción de proteínas y su purificación en cantidades suficientes, se consideró importante evaluar proteínas recombinantes de este patógeno expresadas en *E. coli* como antígenos candidatos. De esta manera, de las 6 cepas de *B. bacilliformis* se eligió inicialmente a *B. bacilliformis* CIP 77.27, *B. bacilliformis* CIP 57.17 y *B. bacilliformis* CIP 57.18, por tener el DNA genómico en mejores condiciones de integridad y pureza según lo observado en el gel de agarosa al 1 % (figura 8 y 9), como cepas representativas para estimar la calidad de amplificación del gen *ialB* con la enzima AccuPrime<sup>TM</sup> Pfx DNA polymerase, que era la que producía amplicones con extremos trancos requeridos para introducirlos en el vector de clonamiento y expresión pET101/D-TOPO. Luego de observar los amplificados se escogió el DNA genómico de *B. bacilliformis* CIP 57.18, para ensayar los PCR de los genes *ialB* y *flaA*, ya que por cuestiones prácticas, de tiempo y manejo era mejor realizar todos los experimentos con una sola cepa.

Luego de las estandarizaciones respectivas se consiguió amplificar y clonar en marco de lectura los genes *ialB* y *flaA* de manera independiente en el plásmido pET101/D-TOPO, el que fue mantenido en la cepa *E. coli* One Shot TOP10 para su posterior aislamiento y caracterización. Para la obtención de los plásmidos pET101-*ialB* y pET101-*flaA*, fue de mayor utilidad el empleo del kit QIAprep<sup>®</sup> Miniprep (QUIAGEN), debido a que los DNA plasmídicos se recuperaban con mejor

integridad y estaban casi ausentes las conformaciones atípicas que son la circular abierta y lineal según se haya afectado a una o a las dos hebras del DNA, predominando la banda superenrollada, la misma que se observó más acorde con el peso esperado que era de 6311 pb y 6881 pb (Figura 30), según se tratase de los plásmidos pET101-*ialB* o pET101-*flaA* respectivamente, a partir de los cuales a través de una PCR usando los oligonucleótidos del vector T7, se comprobó la presencia de los insertos *ialB* y *flaA* sin alteración en cuanto al tamaño esperado.

La secuenciación de los genes *ialB* y *flaA* a partir de los DNA plasmídicos y sus respectivos alineamientos, revelaron altos porcentajes de identidad, lo que confirmaba el éxito de la clonación de ambos genes de *B. bacilliformis* en el vector pET101/D-TOPO, el cual al añadir un cola de 6 histidinas a la proteína de interés facilitó su purificación por afinidad usando agarosa-Ni. El haber introducido las construcciones pET101-*ialB* o pET101-*flaA* por transformación en la cepa *Escherichia coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3), permitió la expresión de las proteínas recombinantes IalB y FlaA en gran escala utilizando necesariamente para ello IPTG, así como su posterior purificación en condiciones nativas. La temperatura y tiempo de incubación ensayados en la estandarización de este experimentos evitaron los inconvenientes de encontrar a ambas proteínas recombinantes IalB y FlaA en cuerpos de inclusión (fracción insoluble) como anteriormente ya se había reportado (Benson et al., 1986) y con ello no se tuvo dificultades en la recuperación y purificación. Además empleando un vector de clonación y expresión que añade a la proteína en estudio una cola de 6 histidinas y no produce proteínas de fusión ligadas a GST (Glutación-S-transferasa) desecha el problema previamente reportado respecto a que GST presenta una alta reactividad antigénica que posiblemente alteraría la reactividad de la proteína de fusión (Gallegos et al., 2005), no siendo entonces indispensable que la proteína recombinante sea liberada del la cola de 6 histidinas para recién poder evaluar su posible poder inmunógeno.

Una vez obtenidas ambas proteínas recombinantes puras, vino el problema de que animal de experimentación elegir para evaluar el papel inmunogénico de IalB y FlaA, ya que uno de los principales inconvenientes para explicar claramente sobre la patogenicidad de *B. bacilliformis*, es la falta de modelos animales de infección y experimentación que faciliten determinar esquemas apropiados de inmunidad

protectora para los seres humanos en ese modelo. Desde la época en que Noguchi (1926) utilizó a monos Rhesus no se han establecido nuevos modelos para el estudio de *B. bacilliformis*, por eso no existen criterios claros para escoger entre los modelos genéricos como ratones, conejos, etc (Dehio, 2001). Entonces con la idea de evitar inconvenientes en la colecta de cantidades adecuadas de sangre del animal inoculado, se descartó usar ratones y en su lugar se decidió emplear conejos. Sin embargo, este modelo animal además de necesitar en la inmunización mayor cantidad de proteína recombinante purificada también tiene el inconveniente que no permite evaluar por ejemplo inmunidad celular por no contar en el mercado comercial con un anti interferón gamma ( $\gamma$ IFN) de conejo como si se encuentra para ratón.

El protocolo de inmunización ensayado posibilitó obtener una respuesta inmune humoral en los conejos, ya que a partir de los plasmas colectados se cuantificó por ELISA directo elevados títulos de anticuerpos IgG anti-IalB e IgG anti-FlaA. Los ensayos de western blot evidenciaron la especificidad de los anticuerpos IgG generados, ya que en cada caso se evidenció una única banda que correspondía a la unión específica de las IgG con su correspondiente proteína recombinante pura (antígeno), así como a la proteína nativa presente en los lisados totales de *B. bacilliformis* lo que además hace intuir de su buen papel inmunógeno, lo que podría significar que IalB y FlaA de *B. bacilliformis* al ser tratados con anticuerpos séricos anti-IalB o anti-FlaA posiblemente perderían su capacidad de parasitar eritrocitos con lo que quizá se obtendría una respuesta inmune protectora, y si así fuese estas proteínas podrían ser tomadas como candidatos para estudios tendientes a desarrollar una vacuna recombinante, sin embargo se considera que sería necesario evaluar esta misma especificidad en sueros de pacientes con Enfermedad de Carrión.

## 6. CONCLUSIONES

- El gen *ialB* no es exclusivo de *Bartonella bacilliformis*, en este trabajo se reporta la presencia del gen *ialB* en *B. clarridgeiae*. En este sentido, el gen *ialB* como marcador molecular único para la detección de *Bartonella bacilliformis* debe ser desestimado.
- *Bartonella bacilliformis* presenta una resistencia constitutiva a las quinolonas, lo cual está relacionado con la presencia de una Ala en la posición 91 y 85 de las proteínas GyrA y ParC respectivamente. Estos resultados son discordantes con las pautas clínicas actuales que recomiendan el uso de ciprofloxacina para el tratamiento de la Enfermedad de Carrión.
- Las proteínas recombinantes IalB y FlaA de *B. bacilliformis* se expresan bien en *E. coli*, en gran escala no sufren procesamiento y se corresponden con el tamaño esperado, son inducibles con IPTG, y su purificación es posible a través de la cola de 6 histidinas.
- Las proteínas IalB y FlaA tienen capacidad antigénica para inducir respuesta humoral en conejos adultos. FlaA tiene mayor capacidad antigénica porque se han encontrado mayores títulos de anticuerpos.
- Estas proteínas son antígenos para investigaciones orientadas a diseñar una vacuna recombinante contra la infección por esta bacteria.

## 7. RECOMENDACIONES

- Las características morfológicas de las colonias podrían ayudar a identificar al género *Bartonella*, pero para llegar a una identificación a nivel de especie es necesario hacer uso de la biología molecular.
- Utilizar sangre desfibrinada y fresca de carnero y caballo, en lugar de sangre con anticoagulante para evitar interferencias del crecimiento celular y verificar que la proporción de paquete celular y plasma sean equivalentes.
- Es preferible usar en lugar de medios monofásicos que tienen sólo agar sangre los medios bifásicos, para evitar la resequedad del medio, y emplear como fase líquida de los hemocultivos caldo BHI. Sin embargo, en experimentos de susceptibilidad antimicrobiana los medios monofásicos son preferidos.
- Las pautas correctas para el tratamiento de la Enfermedad de Carrión necesitan ser establecidas desde amplios estudios epidemiológicos. Para ello se requiere de un número considerable de cepas clínicas.
- Coordinar con las autoridades del Instituto Nacional de Salud la autorización correspondiente que permita obtener cepas clínicas de *B. bacilliformis* de reciente aislamiento, ya que este organismo es el órgano competente que coordina con toda una red de laboratorios, la atención de pacientes con Enfermedad de Carrión, que son la fuente indispensable que facilitaría la obtención de un número adecuado de material biológico que hagan posible establecer tratamientos y métodos de diagnóstico efectivos que erradiquen al patógeno y no sólo lo amortiguen. Además tener a la mano cepas silvestres de *B. bacilliformis* y sueros de pacientes facilitarían investigaciones enfocadas en la búsqueda de diagnósticos rápidos, específicos y efectivos, así como de la elección de adecuados inmunógenos que puedan ser evaluados en estudios destinados al desarrollo de una vacuna recombinante.
- Promover convenios de cooperación internacional que hagan factible complementar las investigaciones formuladas en Perú, con grandes laboratorios que tengan a su disposición mayor y mejor infraestructura, así como insumos moleculares, que muchas veces están ausentes en nuestro medio por limitaciones económicas que de alguna manera imposibilitan poner en práctica las ideas plasmadas en el papel.



## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amano, Y.; Rumbea, J.; Knobloch, J.; Olson, J. and Kron. M. 1997. Bartonellosis in Ecuador: serosurvey and current status of cutaneous verrucous disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 57:174-179.
- Angelakis, E.; Biswas, S.; Taylor, C.; Raoult, D. and Rolain, J. 2008. Heterogeneity of susceptibility to fluoroquinolones in *Bartonella* isolates from Australia reveals a natural mutation in *gyrA*. J. of Antimicrob. Chemother. 61(6):1252-1255.
- Ausubel, F.; Brent, R.; Moore, D.; Seidman, J.; Smith, J. and Struhl, K. 1997. Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons Inc., New York.
- Avidor, B.; Graidy, M.; Efrat, G.; Leibowitz, C.; Shapira, G.; Schattner, A.; Zimhony, O. and Giladi, M. 2004. *Bartonella koehlerae*, a new cat-associated agent of culture-negative human endocarditis. J Clin Microbiol. 42 (8):3462-3468.
- Battisti, J. and Minnick, M. 1999. Development of a System for Genetic Manipulation of *Bartonella bacilliformis*. Applied and Environmental Microbiology. 65 (8): 3441–3448.
- Batterman, H.; Peek, J.; Loutit, J.; Falkow, S. and Tompkins, L. 1995. *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* adherence to and entry into cultured human epithelial cells. Infect Immun. 63:4553–4556.
- Bauer, A.; Kirby, W.; Sherris, J. and Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized disk method. Am. J. Clin. Pathol. 45: 493-496.
- Benson, L.; Kar, S.; Mc Laughlin, G. and Ihler, G. 1986. Entry of *Bartonella bacilliformis* into erythrocytes. Infect. Immun. 54 (2): 347-353.
- Birtles, R.; Canales, J.; Ventosilla, P.; Alvarez, E.; Guerra, H.; Llanos-Cuentas, A.; Raoult, D; Doshi, N. and Harrison, T. 1999. Survey of *Bartonella* species infecting intradomicillary animals in the huayllacalla'n valley, Ancash, Peru, a region endemic for human bartonellosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 60(5): 799–805.
- Birtles, R.; Hazel, S.; Bown, K.; Raoult, D.; Begon, M. and Bennett, M. 2000. Subtyping of uncultured bartonella using sequence comparison of 16S/23S rRNA

intergenic spacer regions amplified directly from infected blood. Mol. Cell. Probes. 14 (2):79-87.

- Birtles, R.; Fry, N.; Ventosilla, P.; Cáceres, A.; Sanchez, E.; Vizcarra, H. and Raoult, D. 2002. Identification of *Bartonella bacilliformis* genotypes and their relevance to epidemiological investigations of human bartonellosis. J. Clin. Microbiol. 40 (10): 3606-3612.
- Biswas, S.; Raoult, D. and Rolain, J.M. 2007. Molecular mechanisms of resistance to antibiotics in *Bartonella bacilliformis*. J. Antimicrob. Chemother. 59: 1065-1070.
- Blanco, J. y Raoult, D. 2005. Enfermedades producidas por *Bartonella* spp. Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica. 23(5): 313-320.
- Boletín Epidemiológico. 2004. Ministerio de Salud del Perú. Oficina General de Epidemiología. Semanal N° 09.
- Boletín Epidemiológico. 2007. Órgano oficial de difusión técnica de la Dirección General de Epidemiología y la Red Nacional de Epidemiología (RENACE). Ministerio de Salud, Lima-Perú. Vol (16): 22.
- Boletín Epidemiológico. 2008. Órgano oficial de difusión técnica de la Dirección General de Epidemiología y la Red Nacional de Epidemiología (RENACE). Ministerio de Salud, Lima-Perú. Vol (17): 25.
- Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem. 72:248-254.
- Brenner, J.; O'connor, S.; Hollis, D.; Weaver, R. and Steigerwalt, A. 1991. Molecular Characterization and Proposal of a Neotype Strain for *Bartonella bacilliformis*. J. Clin. Microbiol. 29 (7): 1299-1302.
- Burstein, Z. y Mayta, P. 2007. En defensa de la denominación como “Enfermedad de Carrión” para la Bartonelosis humana producida por la *Bartonella bacilliformis*. Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública 24(2): 103- 106.
- Cáceres, H.; Rodriguez, J.; Bravo, F.; Maguina, C.; Diaz, C; Ramos, D. and Patarca, R. 1995. Verruga peruana: an infectious endemic angiomatosis. Crit. Rev. Oncog. 6:47–56.

- Callison, J.; Battisti, J.; Sappington, K.; Smitherman, L and Minnick, M. 2005. Characterization and expression analysis of the groESL operon of *Bartonella bacilliformis*. Gene 359: 53 – 62.
- Cartwright, J.L.; Britton, P.; Minnick, M.F. and McLennan, A. G. 1999. The *IalA* invasion gene of *Bartonella bacilliformis* encodes a (de) nucleoside polyphosphate hydrolase of the MutT motif family and has homologs in other invasive bacteria. Biochem. Biophys. Res. Commun. 256: 474 – 479.
- Chamberlin, J.; Laughlin, L.; Gordon, S.; Romero, S.; Solórzano, N. and Regnery, R. 2000. Serodiagnosis of *Bartonella bacilliformis* Infection by Indirect Fluorescence Antibody Assay: Test Development and Application to a Population in an Area of Bartonellosis Endemicity. J. Clin Microb. 38(11): 4269-4271.
- Chamberlin, J.; Laughlin, L.; Romero, S.; Solórzano, N.; Gordon, S.; Andre, R.; Pachas, P.; Friedman, H.; Ponce, C. and Watts, D. 2002. Epidemiology of Endemic *Bartonella bacilliformis*: A prospective cohort study in a peruvian mountain valley community. J. Infect. Dis. 186: 983-990.
- Chung, C. and Miller, H. 1988. A rapid and Convenient Method for the Preparation and Storage of Competent Bacterial Cells. Nucleic Acids Res. 16 (8): 3580.
- Clarridge, J.; Raich, T.; Pirwani, D.; Simon, B.; Tsai, L.; Rodríguez, M.; Regnery, R.; Zollo, A.; Jones, D. and Rambo, C. 1995. Strategy to detect and identify *Bartonella* species in routine clinical laboratory yields *Bartonella henselae* from human immunodeficiency virus-positive patient and unique *Bartonella* strain from his cat. J Clin Microbiol. 33: 2107-2113.
- Coleman, S. and Minnick, M. 2001. Establishing a direct role for the *Bartonella bacilliformis* invasion-associated locus B (*IalB*) protein in human erythrocyte parasitism. Infect. Immun. 69: 4373-4381.
- Coleman, S. and Minnick, M. 2003. Differential expression of the invasion-associated locus B (*ialB*) gene of *Bartonella bacilliformis* in response to environmental cues. Microbial Pathogenesis 34: 179–186.
- Colichón, H. and De Bedon, C. 1973. Carrion's disease: useful nutrients for the growth of *Bartonella bacilliformis*. Rev. Lat. Microbiol. 15 (2): 75-79.

- Contreras, G. 1994. Historia y aportes al conocimiento de la inmunología en la Verruga Peruana. 1ª Edición. Academia Nacional de Medicina. Incorporación del Académico Titular. Editado por Boehringer Ingelheim, Lima – Perú.
- Conyers, G. B. and Bessman, M. J. 1999. The gene *ialA* associated with the invasion of human erythrocytes by *Bartonella bacilliformis*, designates a nudix hydrolase active on dinucleoside 5'-polyphosphates. *J. Biol. Chem.* 274: 1203-1206.
- Crowe, J.; Masone, B. and Ribbe, J. 1996. One-step purification of recombinant proteins with the 6xHis tag and Ni-NTA resin. *Methods Mol. Biol.* 58:491-510.
- Delidow, B.C.; Lynch, J.P.; Peluso, J.J. and White, B.A. 1996. Polymerase chain reaction, en "Basic DNA and RNA protocols". Editado por Harwood, A. J., Humana Press Inc., NJ, USA, pp. 275 – 92.
- Dehio, C.; Meyer, M.; Berger, J.; Schwarz, H. and Lanz, C. 1997. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalisation of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome. *J Cell Sci.* 110: 2141–2154.
- Dehio, C. 2001. *Bartonella* interactions with endothelial cells and erythrocytes *Trends in Microbiology* 1 (9): 279-285.
- Dehio, C. 2004. Molecular and Cellular Basis of *Bartonella* Pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 58: 365-390.
- Dörbecker, C.; Sander, A.; Oberle, K. and Schülin-Casonato, T. 2006. *In vitro* susceptibility of *Bartonella* species to 17 antimicrobial compounds: comparison of Etest and agar dilution. *J. Antimicrob. Chemother.* 58: 784-788.
- Ellis, B.; Rotz, L.; Leake, J.; Samalvides, F.; Bernable, J.; Ventura, G. and Padilla, C.; Villaseca, C.; Beati, L.; Regnery, R. Childs, J. Olson J. and Carrillo, C. 1999. An outbreak of acute bartonellosis (Oroya fever) in the Urubamba region of Peru, 1998. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61:344-349.
- Ereemeeva, M.; Gerns, H.; Lydy, S.; Goo, J.; Ryan, E.; Mathew, S.; Ferraro, M.; Holden, J.; Nicholson, W.; Dasch, G. and Koehler, J. 2007. Bacteremia, fever and splenomegaly caused by a newly recognized bartonella species. *The New England Journal of Medicine.* 356:2381-2387.

- Frederick, M.; Brent, R.; Kingston, R.; Moore, D.; Seidman, J.; Smith, J. and Struhl, K. 1997. Short Protocols in Molecular Biology. Third Edition. Published by John Wiley & Sons, Inc., Canada.
- Gallegos, K.; Baldeviano, Ch.; Marcelo, A. y Padilla, C. 2005. Clonamiento, expression y seroreactividad del antígeno recombinante flagelina de *Bartonella bacilliformis*. Rev Peru Med Exp Salud Pública 22 (1): 39-46.
- Hall, T. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, Nucleic Acids Symp. Ser. 41: 95–98.
- Han, X.Y. and Andrade, R.A. 2005. *Brevundimonas diminuta* infections and its resistance to fluoroquinolones. J. Antimicrob. Chemother. 55: 853-859.
- Henríquez, C.; Infante, B.; Merello, J.; Gal'ino, M.; Santibáñez, L.; Maguiña, C.; Guerra, H.; Birtles, R. y Ventosilla, P. 2002. Identificación de *Bartonella bacilliformis* por métodos moleculares. Rev. Med. Hered. 13 (2): 58-63.
- Huarcaya, E.; Ventosilla, P.; Maguiña, C.; Merello, J.; Infante, B.; Cox, J.; Guerra, H.; Tello, A.; Roul, D. y Birtles, R. 2001. Primer reporte de *Bartonella henselae* y *Bartonella clarridgeiae* en pacientes con enfermedad del arañazo de gato y angiomatosis bacilar en Lima. Diagnóstico 40 (1): 13-19.
- Huarcaya, E.; Maguiña, C.; Merello, J.; Cok, J.; Birtles, R.; Infante, B.; Vidal, J.; Tello, A. and Ventosilla, P. 2002. A prospective study of Cat-Scratch Disease in Lima-Peru. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 44 (6): 325-330.
- Huarcaya, E.; Infante, B.; Maguiña, C.; Merello, J.; Birtles, R. y Ventosilla, P. 2003. Identificación de *Bartonella* sp mediante reacción en cadena de la Polimerasa y métodos microbiológicos. Rev. Diagnóstico. 42 (3): 513-516.
- Ihler, G. 1996. *Bartonella bacilliformis*: dangerous pathogen slowly emerging from deep background. FEMS Microbiol. Letters. 144: 1-11.
- Invitrogen. 2006. Champion<sup>TM</sup> pET Direccional TOPO® expresión Kits. Versión H.
- Karem, K.L.; Dubois, K. A.; McGill, S.L.; Regnery, R.L.; 1999. Characterization of *Bartonella henselae*-specific immunity in BALB/c mice. Immunology. 97(2):352-358.
- Karem, K. L. 2000. Immune aspects of *Bartonella*. Critic. Rev. in Microbiol. 26(3):133-145.

- Khan, W.A.; Seas, C.; Dhar, U.; Salam, M.A. and Bennish, M.L. 1997. Treatment of Shigellosis: V. Comparison of azithromycin and ciprofloxacin. *Ann Intern Med.* 126: 697-703.
- Knobloch, J.; Solano, L.; Alvarez, O. and Delgado, E. 1985. Antibodies to *Bartonella bacilliformis* as determined by fluorescent test, indirect hemagglutination and ELISA. *Trop. Med. Parasitol.* 36 (4):183-185.
- Knobloch, J. 1988. Analisis and preparation of *Bartonella bacilliformis* antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39:173-178.
- Knobloch, J. and Schreiber, M. 1990. Bb65 a major immunoreactive protein of *Bartonella bacilliformis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 43:373-379.
- Kordick, D. and Breitschwerdt, E. 1995. Intraerythrocytic presence of *Bartonella henselae*. *J. Clin. Microbiol.* 33:1655–1656.
- Kordick, D.; Hilyard, E.; Hadfield, T.; Wilson, K.; Steigerwalt, A.; Brenner, D. and Breitschwerdt, E. 1997. *Bartonella clarridgeiae*, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenopathy (Cat Scratch Disease). *J. Clin. Microbiol.* 35 (7): 1813-1818.
- Krueger, C.M.; Marks, K.L. and Ihler, G.M. 1995. Physical map of the *Bartonella bacilliformis* genome. *J. Bacteriol.* 177 (24): 7271 – 7274.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Maguiña, C. 1993. Estudio clínico de 145 casos de Bartonelosis en el Hospital Nacional Cayetano Heredia: 1969 - 1992. Tesis para optar el Grado de Doctor en Medicina. Escuela de Postgrado, U.P.C.H., Lima-Perú.
- Maguiña, C. 1998. Bartonelosis o Enfermedad de Carrion. Nuevos aspectos de una vieja enfermedad. A.F.A. Editores Importadores S. A., Lima, Perú.
- Maguiña, C. and Gotuzzo, E. 2000. Bartonellosis-new and old. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 14:1-22.
- Maguiña C.; Garcia, P.J.; Gotuzzo, E.; Cordero, L. and Spach, D.H. 2001. Bartonellosis (Carrion's disease) in the modern era. *Clin. Infect. Dis.* 33:772-779.
- Mallqui, E. 1998. Inmunoelctrotransferencia como método de diagnóstico para la detección de bartonelosis. Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo

con mención en Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas. U.N.M.S.M., Lima, Perú.

- Mallqui, V.; Speelman, E.; Verástegui, M.; Maguiña, C.; Pinell-Salles, P.; Lavarello, R.; Delgado, J. Kosek, M.; Romero, S.; Arana, Y. and Gilman, R. 2000. Sonicated Diagnostic Immunoblot for Bartonellosis. Clin. and Diagnostic Laboratory Immun. 7 (1): 1-5.
- Massei, F.; Gori, L.; Macchia, P. and Maggiore, G. 2005. The expanded spectrum of bartonellosis in children. Infect. Dis. Clin. North. Am. 19(3): 691-711.
- Maurin, M.; Birtles, R.; and Raoult, D. 1997. Current Knowledge of *Bartonella* species. Eur. J. Clin.Microbiol. Infect. Dis.16: 487-506.
- Mernaugh, G.; and Ihler, G.M. 1992. Deformation factor: an extracellular protein synthesized by *Bartonella bacilliformis* that deforms erythrocyte membranes. Infect. Immun. 60:937-943.
- Minnick, M. 1994. Identification of outer membrane proteins of *Bartonella bacilliformis*. Infect. Immun. 62 (6): 2644-2648.
- Minnick, M.F.; Mitchell, S.J. and Mc Allister, S.J. 1996. Cell entry and the pathogenesis of *Bartonella* infections. Trends Microbiol. 4 (9): 343-7.
- Minnick, M.F. and Anderson, B. E. 2000. *Bartonella* interactions with host cells. Subcell. Biochem. 33: 97-123.
- Minnick, M.F.; Wilson, Z.R.; Smitherman, L.S. and Samuels, D.S. 2003. *gyrA* mutations in ciprofloxacin-resistant *Bartonella bacilliformis* strains obtained *in vitro*. Antimicrob. Agents Chemother. 47 (1): 383-6.
- MINSA (Ministerio de Salud, Perú). 2003. Normas técnicas para el diagnóstico y atención curativa de la Bartonellosis o Enfermedad de Carrion en el Perú. Lima, Perú.
- MINSA (Ministerio de Salud, Perú). 2006. Norma Técnica de salud para la Atención de la Bartonelisis o Enfermedad de Carrión en el Perú. Norma N° 048-MINSA/DGSP-V.01. Dirección General de Salud de las personas. Estrategia sanitaria de prevención y control de las enfermedades metaxénicas y otras transmitidas por vectores.
- Mitchell, S. and Minnick, M. 1995. Characterization of a two gene locus from *Bartonella bacilliformis* associated with the ability to invade human erythrocytes. Infect. Immun. 63:1552- 62.

- Mitchell, S. and Minnick, M. 1997. A carboxy-terminal processing protease gene is located immediately upstream of the invasion-associated locus from *Bartonella bacilliformis*. Microbiology 143: 1221-1233.
- Murray, V. 1989. Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. Nucleic Acids. Res. 17:8889.
- Noguchi, H. 1926. Etiology of Oroya Fever. IV. The effect of inoculation of anthropoid apes with *Bartonella bacilliformis*. From the Laboratories of the Rockefeller Institute for Medical Research. Plate 25 to 28.
- Pachas, P. 2001. Enfermedad de Carrión (Bartonelosis) en el Perú. Módulos Técnicos, Serie de documentos Monográficos N° 13. Lima, Ministerio de Salud, Oficina General de Epidemiología, Instituto Nacional de Salud.
- Pachas, P.; Solorzano, N.; Chiroque, J.; Rojas, Y.; Chancafe, J.; Tarazona, A.; Godenzi, J.; Quiroz, M.; Segovia, C. and Jones, F. 2004. Value of the thin smear in the diagnosis of human bartonellosis (Carrión's disease). American Society of Tropical Medicine and Hygiene 53rd Annual Meeting. Miami, Florida USA.
- Padilla, C.; Carrillo, C.; Barbara, E.; Ventura, G. y Montoya, Y. 1998. Detección de *Bartonella bacilliformis* utilizando PCR-RFLP. Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública 15 (1-2): 34-36.
- Padilla, C. y Ventura, G. 2003. Diseño y estandarización de una prueba de PCR para el diagnóstico de la bartonelosis causada por *Bartonella bacilliformis*. Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública 20 (1): 5-8.
- Padilla, C.; Gallegos, K.; Marcelo, A.; Chenet, S. y Baldeviano, C. 2006. Expresión y serorreactividad de la lipoproteína recombinante de 43-kda de *Bartonella bacilliformis*. Rev Peru Med Exp Salud Pública 23(3): 182-187.
- Padmalayan, I.; Anderson, B.; Kron, M.; Kelly, T. and Baumstark, B. 1997. The 75-kilodalton antigen of *Bartonella bacilliformis* is a structural homolog of the cell division protein FtsZ. J. Bacteriol. 179 (14): 4545-52.
- Patrucco, R. 1983. Estudio de los parámetros inmunológicos en pacientes portadores de la Enfermedad de Carrión (Bartonelosis humana). Diagnóstico 12(4): 128 – 144.
- Persing, D.; Tenover, F.; Versalovic, J.; Tang, Y.; Unger, E.; Relman, D. and White, T. 2004. In: Molecular Microbiology. Diagnostic Principles and Practice. ASM Press, Washington – USA. 724pp.



- Pozo, E.; Troncos, G.; Palacios, A.; Arévalo, F.; Carrión, G. y Laguna, A. 2005. Distribución y hospederos de pulgas (Siphonaptera) en la provincia de Ayabaca, Piura-1999. Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública 22(4): 316-320.
- Ramon, J. y Raoult, D. 2005. Enfermedades producidas por *Bartonella* spp. Enfermedades Infecciosas. Microbiología Clínica. 23(5):313-320.
- Raoult, D.; Birtles, R.; Montoya, M.; Perez, E.; Tissot-Dupont, H.; Poux, V. and Guerra, H. 1999. Survey of three bacterial louse-associated disease among rural Andean communities in Peru: prevalence of epidemic typhus, trench fever, and relapsing. Clin. Infect. Dis. 29: 434-436.
- Regnath, T.; Mielke, M.E.A.; Arvand, M. and Hahn, H. 1998. Murine model of *Bartonella henselae* infection in the immunocompetent host. Infect. Immun. 66:5534-5536.
- Relman, D.; Loutit, J.; Schmith, T.; Falkow, S. and Tompkins, L. 1990. The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens. N. Engl. J. Med. 323: 1573-1580.
- Renesto, P.; Gouvernet, J.; Drancourt, M.; Roux, V. and Raoult, D. 2001. Use of rpoB Gene Analysis for Detection and Identification of *Bartonella* Species. J. Clin. Microbiol. 39 (2): 430-437.
- Reynafarje, C. and Ramos, J. 1961. The hemolytic anemia of human bartonellosis. Blood 17:562-578.
- Robicsek, A.; Strahilevitz, J.; Jacoby, G.A.; Macielag, M.; Abbanat, D.; Bush, K. and Hooper, D.C. 2006. Fluoroquinolone modifying enzyme: a novel adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. Nat. Med. 12:83-88.
- Roig, J.; Casal, J.; Gispert, P. and Gea, E. 2006. 13-Antibiotic therapy of community-acquired pneumonia (CAP) caused by atypical agents. Med. Mal. Infect. 36: 680-689.
- Rolain, J.; Maurin, M. and Raoult, D. 2000. Bactericidal effect of antibiotics on *Bartonella* and *Brucella* spp.: clinical implications. Antimicrob. Chemother. 46: 811-814.
- Rolain, J.; Foucault, C.; Guieu, R.; La Scola, B.; Brouqui, P. and Raoult, D. 2002. *Bartonella quintana* in human erythrocytes. Lancet. 360:226-228.

- Rolain, J.M.; Novelli, S.; Ventosilla, P.; Maguina, C.; Guerra, H. and Raoult, D. 2003. Immunofluorescence detection of *Bartonella bacilliformis* flagella *in vitro* and *in vivo* in human red blood cells as viewed by laser confocal microscopy. Ann. N.Y. Acad. Sci. 990: 581-584.
- Rolain, J.M.; Brouqui, P.; Koehler, J.E.; Maguiña, C.; Dolan, M.J. and Raoult, D. 2004. Recommendations for treatment of human infections caused by *Bartonella* species. Antimicrob. Agents Chemother. 48:1921-1933.
- Ruiz, J.; Gómez, J.; Navia, M.M.; Ribera, A.; Sierra, J.M.; Marco, F.; Mensa, J. and Vila, J. 2002. High prevalence of nalidixic acid resistant, ciprofloxacin susceptible phenotype among clinical isolates of *Escherichia coli* and other *Enterobacteriaceae*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 42: 257-61.
- Ruiz, J. 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA Gyrase protection. J. Antimicrob. Chemother. 51: 1109-1117.
- Saenz, Y.; Ruiz, J.; Zarazaga, M.; Teixidó, M.; Torres, C. and Vila, J. 2004. Effect of the efflux pump inhibitor Phe-Arg- $\beta$ -naphthylamide on the MIC values of the quinolones, tetracycline and chloramphenicol, in *Escherichia coli* isolates of different origin. J. Antimicrob. Chemother. 53: 544-545.
- Salazar de Vegas, E.Z.; Nieves, B.; Araque, M.; Velasco, E.; Ruiz, J. and Vila, J. 2006. Outbreak Caused by *Acinetobacter* strain RUH 1139 in an Intensive Care Unit. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 27: 397-403.
- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, N.Y.
- Sanchez, E.; Maguiña, C.; Gotuzzo, E.; Guerra, H.; Ventocilla, P. and Perez, E. 1998. Study of new endemic areas of human bartonellosis in Peru. Abstracts from 24th International Congress of Internal Medicine. Page 48. November 3 - 7th, Lima, Peru.
- Sander, A.; Zagrosek, A.; Bredt, W.; Schiltz, E.; Pie'mont, Y.; Lanz, C. and Dehio, C. 2000 Characterization of *Bartonella clarridgeiae* flagellin (FlaA) and detection of anti-flagellin antibodies in patients with lymphadenopathy. J. of Clinical Microb. 38 (8): 2943-2948.
- Sanger, F.; Nicklen, S. and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. 74:5463-5467.

- Sayan, J. 2006. Bartonelosis enfermedad reemergente. Revista Electrónica de PortalesMédicos.com
- Scherer, D.C.; DeBuron-Connors, I. and Minnick, M.F. 1993. Characterization of *Bartonella bacilliformis* flagella and effect of anti-flagellin antibodies on invasion of human erythrocytes. Infect. Immun. 61: 4962 – 71.
- Solano, M. y Solano L. 1991. La Enfermedad de Carrión y la biología de *Bartonella bacilliformis*. Rev. Med. Trop. U.N.M.S.M. 5:13-18.
- Sobraques, M.; Maurin, M.; Birtles, R.J. and Raoult, D. 1999. *In vitro* susceptibilities of four *Bartonella bacilliformis* strains to 30 antibiotic compounds. Antimicrob Agents Chemother. 43: 2090-2092.
- Tarazona, A.; Maguiña, C.; López de Guimaraes, D.; Montoya, M. and Pachas, P. 2006. Terapia antibiótica para el manejo de la Bartonelosis o Enfermedad de Carrión en el Perú. Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública 23:188-200.
- Tavio, M.M.; Vila, J.; Ruiz, J.; Ruiz, J.; Martin-Sanchez, A.M. and Jiménez de Anta, M.T. 1999. Mechanisms involved in the development of resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* strains. J. Antimicrob. Chemother. 44: 735-742.
- Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice, Nucleic Acids Res. 22: 4673–4680.
- Turan, H.; Arslan, H.; Azap, O.K.; Serefhanoglu, K. and Uncu, H. 2007. *In vitro* antibacterial activity of tigecycline in comparison with doxycycline, ciprofloxacin and rifampicin against *Brucella* spp. Int. J. Antimicrob. Agents. 30: 186-187.
- Ventura, G. y Padilla, C. 2006. Diagnóstico bacteriológico de la bartonelosis humana o enfermedad de Carrión. Ministerio de Salud – Instituto Nacional de Salud.
- Vila, J.; Vargas, M.; Ruiz, J.; Corachan, M.; Jiménez de Anta, M.T. and Gascón, J. 2000. Quinolone resistance in enterotoxigenic *Escherichia coli* causing diarrhea in travelers to India in comparison with travelers to other geographical areas. Antimicrob. Agents. Chemother. 44: 1731-1733.

- Vila, J.; Vargas, M.; Ruiz, J.; Espasa, M.; Pujol, M.; Corachán, M., Jiménez de Anta, M.T. and Gascon, J. 2001. Susceptibility patterns of enteroaggregative *Escherichia coli* associated to traveller's diarrhoea. Emergence of quinolone resistance. J. Med. Microbiol. 50: 996-1000.
- Wain, J.; Hoa, N.T.; Chinh, N.T.; Vinh, H.; Everett, M.J.; Diep, T.S.; Day, N.P.; Solomon, T.; White, N.J.; Piddock, L.J. and Parry, C.M. 1997. Quinolone-resistant *Salmonella typhi* in Viet Nam: molecular basis of resistance and clinical response to treatment. Clin Infect Dis. 25 (6): 1404-1410.
- Walker, S. and Winkler, H. 1981. *Bartonella bacilliformis*: colonial types and erythrocyte adherence. Infection and immunity. 31(1): 480-486.
- Xu, Y.H.; Lu, Z.Y. and Ihler, G.M. 1995. Purification of deformin, an extracellular protein synthesized by *Bartonella bacilliformis* which causes deformation of erythrocyte membranes. Biochim Biophys Acta. 1234(2):173-83.
- Zeaiter, Z.; Fournier, P.; Ogata, H and Raoult, D. 2002. Phylogenetic classification of *Bartonella* species by comparing *groEL* sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 52: 165-171.
- Zhou, J.; Lau, W.; Masuoka, P.; Andre R.; Chamberlin, J.; Lawyer, P. and Laughlin, L. 2002. El Niño and the spread of bartonellosis epidemics in Peru. EOS Trans Am Geophysical Union. 83 (14):157.